

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Caracterización de Lipopolisacárido en una cepa mutante de  
*Leptospira interrogans* serovar Lai**

**Sonia Zapata Mena**

**Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de  
Master en Microbiología**

**Quito**

**Diciembre de 2005**

© Derechos de autor  
Sonia Zapata Mena  
2005

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a Gabriel Trueba, quien ha guiado este trabajo de investigación, por todo su apoyo y dedicación brindados para la culminación del mismo.

A los miembros del comité de tesis María de Lourdes Torres y Manuel Baldeón por sus importantes ideas y sugerencias que contribuyeron a este trabajo.

A todas las personas que trabajan en el Laboratorio de Microbiología, en especial a Daysi Pinales.

## **DEDICATORIA**

A mi querido esposo Alfredo, por su apoyo incondicional en todo momento.

A mis padres Carmita y Raúl por su cariño y sabios consejos.

## RESUMEN

Un mutante de lipopolisacárido (LPS) de *Leptospira interrogans* serovar Lai fue seleccionado utilizando el anticuerpo monoclonal F70C711 que reacciona con un epitopo del antígeno O de LPS. La ausencia de este epitopo en la cepa mutante fue demostrada por el ensayo de aglutinación microscópica (MAT) y el análisis de western blot. Los perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de las cepas original y mutante, mostraron que la cepa mutante a experimentado una pérdida de masa molecular en la banda que corresponde a la región del antígeno O. Los resultados de PCR y secuenciamiento de los genes del locus *rfb* confirmaron que la cepa mutante tiene el marco de lectura abierto (orf) 14 truncado y la función putativa para este gen es de una enzima polimerasa de antígeno O. Estos resultados sugieren que la cepa mutante ha dejado de producir un epitopo del antígeno O, sin que esto afecte la síntesis de los componentes de LPS incluyendo el antígeno O. Los resultados de este trabajo proveen importante información acerca de la estructura del LPS de *Leptospira* y un posible mecanismo de evasión de la respuesta inmune que consiste en mutaciones puntuales que eliminan epitopos inmunodominantes, sin la alteración de la estructura principal de la molécula de LPS.

Palabras clave: *Leptospira*; Lipopolisacárido; Mutación.

## ABSTRACT

A lipopolysaccharide (LPS) mutant of *Leptospira interrogans* serovar Lai was selected using a monoclonal antibody F70C711 against one O antigen epitope. Absence of this epitope in the mutant strain was demonstrated by MAT (microscopic agglutination test) and western blot analysis. SDS-PAGE profiles of both wild type and mutant strains showed a loss of molecular mass in the band corresponding to the O antigen, in the mutant strain. Additionally, the results of PCR and sequencing of locus *rfb* of the mutant strain confirmed that *orf 14* was truncated; the putative function of this gene is an O antigen polymerase. These results suggested that mutant strain ceased to produce an epitope of O antigen but was still able to synthesize all the components of LPS including O chain. The results of this research provide important information about the LPS structure of *Leptospira* and a potential mechanism of evasion of the immune response consisting in point mutations, which eliminate immunodominant epitopes without altering the main structure of the LPS molecule.

Keywords: *Leptospira*; Lipopolysaccharide; Mutation.

**TABLA DE CONTENIDO**

<b>ABSTRACT</b>	<b>vii</b>
<b>TABLA DE CONTENIDOS</b>	<b>viii</b>
<b>TABLA DE GRAFICOS</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>2. FUNDAMENTOS TEORICOS</b>	<b>2</b>
2.1. Generalidades de <i>Leptospira</i>	2
2.2. Leptospirosis	3
2.2.1. Epidemiología	3
2.2.2. Patogénesis	5
2.2.3. Aspectos clínicos	7
2.3. Lipopolisacárido: Estructura y síntesis	10
2.3.1. Lípido A	11
2.3.1.1. Biosíntesis de lípido A	12
2.3.2. Región central (Core)	16
2.3.2.1. Biosíntesis del Core	16
2.3.3. Antígeno O	17
2.3.3.1. Biosíntesis de Antígeno O	18
2.3.3.2. Polimerización de Antígeno O	21
2.4. Antígenos de superficie de <i>Leptospira</i>	23
2.4.1. Proteínas de membrana externa	23
2.4.2. Lipopolisacárido de <i>Leptospira</i>	25
2.4.2.1. Lípido A de <i>Leptospira</i>	27
2.4.2.2. Antígeno O de <i>Leptospira</i>	28
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>32</b>

3.1. Bacterias y métodos de cultivo	32
3.2. Clonación de cepas de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Lai	32
3.3. Anticuerpos	32
3.4. Selección de la cepa mutante	32
3.5. Test de aglutinación microscópica (MAT)	33
3.6. Extracción de ADN	33
3.7. Fragmentación de ADN con enzimas de restricción	34
3.8. Electroforesis de ADN	34
3.9. Extracción de Lipopolisacárido	34
3.10. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)	34
3.11. Tinción de Lipopolisacárido	35
3.12. Análisis de western blot	35
3.13. Producción de anticuerpos policlonales	36
3.14. Ensayos de virulencia en hámsters	36
3.15. Secuenciamiento del locus <i>rfb</i> de <i>L. interrogans</i> serovar Lai	36
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>37</b>
<b>5. DISCUSION</b>	<b>43</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>47</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>51</b>



**TABLA DE GRAFICOS****FIGURAS**

Figura 1	9
Figura 2	10
Figura 3	11
Figura 4	13
Figura 5	14
Figura 6	14
Figura 7	15
Figura 8	17
Figura 9	18
Figura 10	19
Figura 11	20
Figura 12	22
Figura 13	27

**TABLAS**

Tabla 1	29
Tabla 2	38

**GRAFICOS**

Gráfico 1	40
Gráfico 2	41
Gráfico 3	42

## 1. INTRODUCCION

La leptospirosis es una zoonosis causada por la infección con especies patógenas de *Leptospira*. Actualmente, la leptospirosis es considerada como una enfermedad infecciosa emergente debido a la serie de brotes que se han presentado los últimos años en las Américas y Asia, tanto en zonas urbanas como rurales y en climas tropicales y templados (1, 14).

El lipopolisacárido de *Leptospira* es un antígeno muy importante en la inmunidad contra la leptospirosis, además es el antígeno responsable de las reacciones serológicas que determinan la clasificación en serovariedades y serogrupos (5, 8). A pesar de ello, se conoce muy poco acerca de la química y genética del mismo, debido a que es muy difícil construir mutantes de esta bacteria por transformación genética, que permita entender un poco más acerca de la biogénesis de LPS de *Leptospira* (5).

En este trabajo se seleccionó cepas mutantes de *Leptospira interrogans* serovar Lai, resultado del tratamiento con un anticuerpo monoclonal específico para una región del antígeno O. Las comparaciones que se realizaron entre las cepas original y mutante contribuyen al entendimiento del proceso de ensamblaje de LPS de *Leptospira*.

La leptospirosis es una enfermedad de gran importancia en la salud pública del Ecuador, debido a la serie de brotes de leptospirosis urbana asociados con inundaciones y personas que trabajan con animales. Esta enfermedad también es causante de importantes pérdidas económicas en la industria pecuaria ecuatoriana.

Finalmente, el entendimiento de la estructura y la bioquímica de lipopolisacárido de *Leptospira* son de suma importancia en la investigación de nuevas alternativas de vacunas y por tanto la prevención y control de la leptospirosis.

## 2. FUNDAMENTOS TEORICOS

### 2. 1. GENERALIDADES DE *LEPTOSPIRA*

*Leptospira* es una espiroqueta que pertenece a la familia Leptospiraceae, constituida por tres géneros *Leptospira*, *Leptonema* y *Turneria* (2). Las leptospiras son las únicas espiroquetas patógenas que pueden vivir en el medio ambiente, fuera de un organismo vivo, a diferencia de otras espiroquetas como *Treponema pallidum* ó *Borrelia burdoferi* agentes causales de la sífilis y la enfermedad de Lyme respectivamente (14).

El género *Leptospira* se encuentra filogenéticamente relacionado con otras espiroquetas. Su genoma comprende alrededor de 5000 Kb dividido en dos cromosomas, uno grande de 4400 Kb y otro pequeño de 350 Kb. Contiene algunos elementos IS (insertion sequence) que contienen un gen que codifica para transposasas, por lo tanto cumplen una función en la producción de rearrreglos genéticos (1). Hasta el momento los genomas de *Leptospira interrogans* serovares Lai y Copenhageni han sido secuenciados en su totalidad, esto va a contribuir al entendimiento de los mecanismos moleculares de la fisiología y patogénesis de *Leptospira* y la identificación de nuevos modelos de vacunas (18, 31).

Hasta 1989, el género *Leptospira* fue clasificado en dos especies, *L. interrogans* que incluye a todas las especies patógenas y *L. biflexa* que abarca todas las cepas saprofitas que se encuentran en el medio ambiente (1). A su vez, ambas especies están constituidas por un gran número de serovariedades, definidas por aglutinación después de adsorción cruzada con antígenos homólogos. Se han reconocido más de 60 serovares para *L. biflexa* y alrededor de 200 para *L. interrogans* los cuales han sido agrupados en aproximadamente 24 serogrupos (1, 2, 14).

En la actualidad, gracias a una clasificación basada en estudios de secuenciamiento del gen del segmento de ADN que corresponde al ARN ribosomal 16S, se han definido 16 genespecies de *Leptospira*, que no guardan ninguna relación con la clasificación anterior

(serológica) puesto que dos cepas que se encuentran dentro de una misma serovariedad pueden pertenecer a dos distintas genoespecies (1). La clasificación serológica revela la diversidad antigénica de *Leptospira*, que si bien es cierto no tiene importancia taxonómica constituye un gran aporte en el campo del diagnóstico y epidemiología de la enfermedad (2, 14).

En cuanto a su morfología, *Leptospira* es una espiroqueta delgada que tiene sus extremos puntualizados y uno o ambos se doblan a manera de un signo de interrogación, de ahí el nombre “interrogans”. Tiene dos flagelos (endoflagelos periplásmicos) con inserciones polares localizados en el espacio periplásmico, la estructura proteica del flagelo es compleja. Los flagelos periplásmicos son responsables de los dos tipos de movimientos traslacional y no traslacional (1). La célula tiene una estructura de bacteria Gram negativa caracterizada por una doble membrana separada por un espacio periplásmico, en la membrana externa se encuentra el lipopolisacárido (LPS) de composición similar a otras bacterias Gram negativas, pero con actividad endotóxica reducida (1, 2).

Las leptospiras son bacterias aerobias obligadas cuya temperatura óptima de crecimiento *in vitro* se encuentra entre 28 y 30°C, utilizan la oxidación beta de ácidos grasos de cadena larga como fuente de electrones y estos representan probablemente la única fuente de carbono en la naturaleza. El género *Leptospira* requiere también vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>12</sub> como factores de crecimiento (1). El crecimiento de estas bacterias es lento, en condiciones óptimas se duplican cada 6 u 8 horas (1, 3).

## **2. 2. LEPTOSPIROSIS**

### **2. 2. 1. EPIDEMIOLOGIA**

La leptospirosis es posiblemente la zoonosis más diseminada en el mundo. La fuente de infección en el ser humano es el contacto directo o indirecto con orina de animales infectados. La incidencia de la infección es mayor en regiones tropicales que en zonas templadas, debido a que la supervivencia de la bacteria en el medio ambiente está

favorecida por temperaturas de alrededor de 30 °C. En países tropicales y en vías de desarrollo la exposición del humano a animales infectados con *Leptospira* es más probable, debido a la existencia de reservorios principalmente animales domésticos (1). Por lo general, la enfermedad es estacional donde la mayor incidencia se da en la época de verano tanto en zonas tropicales como en zonas templadas, adicionalmente se han presentado grandes brotes a consecuencia de inundaciones ocurridas luego de fuertes lluvias debido a la contaminación con orina animal (1, 14). En el Ecuador, entre febrero y julio de 1998 se registró un brote importante de leptospirosis, a consecuencia de las inundaciones producidas por el fenómeno del Niño, se examinaron 807 muestras humanas y 255 resultaron positivas, lo que representa un 31 % de incidencia. El serovar canicola fue encontrado con mayor frecuencia (33).

La puerta de entrada más común de la bacteria al organismo es a través de lastimaduras, cortes en la piel o la conjuntiva del ojo. La mayoría de brotes de leptospirosis se han dado como resultado del contacto prolongado de la piel con agua, inhalación o contacto de las membranas mucosas y tracto respiratorio con aerosoles de orina, sangre o agua contaminada. Excepcionalmente, la infección puede darse por mordeduras de animales o transmisión directa entre humanos, a pesar de que se han reportado algunos casos de transmisión sexual (1).

La supervivencia de *Leptospira* en el medio ambiente depende de varios factores como pH, temperatura y la presencia o ausencia de compuestos inhibidores como metales pesados y detergentes. Bajo condiciones de laboratorio *Leptospira* puede vivir a temperatura ambiente, en un rango de pH que va de 7.2 a 8 por un período de 12 meses (2, 4).

La bacteria puede mantenerse en un ecosistema gracias a la infección crónica de los túbulos renales de los hospedadores de mantenimiento o reservorios que pueden definirse como especies en las cuales la infección es adquirida a temprana edad, no produce sintomatología clínica y excretan leptospiros permanentemente por la orina. Ciertos animales que actúan como hospedadores de mantenimiento de algunas serovariedades de *Leptospira* parecen estar adaptados a la infección específica con estas serovariedades por lo que no presentan

sintomatología clínica, sin embargo, infecciones con otras serovariedades les convierte en hospedadores accidentales que pueden presentar una enfermedad severa o fatal. Los hospedadores de mantenimiento más importantes son mamíferos, los cuales pueden transmitir la infección a animales domésticos de crianza, perros y al ser humano. La tasa de transmisión de la enfermedad depende de factores climáticos, densidad poblacional y el grado de contacto entre hospedadores de mantenimiento y hospedadores accidentales (1, 2).

Algunas especies de roedores pueden ser reservorios de ciertos serovares, en el caso de las ratas son hospedadores de mantenimiento para serovares del serogrupo *Icterohaemorrhagiae* y *Ballum*, mientras tanto que los ratones son para el serogrupo *Ballum* solamente. Dentro de los animales domésticos, las vacas pueden ser reservorios de serovares *Hardjo*, *Pomona* y *Grippotyphosa*; los cerdos de *Pomona*, *Tarassovi* y *Brastislava*, las ovejas de *Hardjo* y *Pomona* y los perros de *Canicola*. El conocimiento de la prevalencia de los serovares y sus hospedadores de mantenimiento es indispensable para entender la epidemiología de la enfermedad en una región (1).

Las infecciones humanas pueden ser adquiridas a través de exposiciones de tipo ocupacional, recreacional o accidental, por lo tanto la ocupación es un factor de riesgo significativo para la infección humana. Dentro de las ocupaciones relacionadas con la infección se encuentran los agricultores, veterinarios, faenadores, inspectores de carne, y en general todas las actividades que implican el contacto directo con animales. Las ocupaciones que implican un contacto indirecto son el caso de los mineros, soldados, pescadores, cortadores de caña y personas que tienen contacto con agua contaminada con *Leptospira*. Finalmente, las actividades recreacionales como deportes acuáticos han sido causa de algunos brotes de leptospirosis en zonas templadas principalmente. Además, se han reportado casos esporádicos de la enfermedad en regiones tropicales adjudicados a exposiciones accidentales que ocurren durante actividades de la vida diaria. Las serovares patógenas que han podido ser recuperadas y aisladas de agua de regiones tropicales y Estados Unidos son *Icterohaemorrhagiae*, *Dakota*, *Ballum*, *Pomona* y *Grippotyphosa* (1).

De acuerdo con Faine existen tres patrones epidemiológicos en la leptospirosis. El primero ocurre en climas templados donde pocos serovares están involucrados y la infección humana ocurre casi invariablemente por contacto directo con animales infectados; el control por inmunización es posible en animales y humanos. El segundo caso ocurre en zonas tropicales húmedas donde existen más serovares que pueden infectar personas y animales y un gran número de reservorios incluyendo roedores y animales domésticos; la exposición humana no está limitada solamente a la ocupación sino a contaminación ambiental particularmente durante la estación lluviosa. Y el tercer caso comprende la leptospirosis urbana que está asociada principalmente a la transmisión por roedores y perros como principales reservorios. Este tipo de infección urbana es frecuente en países en vías de desarrollo, como sucede en las favelas de Salvador Bahía (Brasil) donde la población de ratas y perros es prominente. (1, 14). Aspectos nuevos en la epidemiología de la leptospirosis constituyen el sistema de información geográfica (GIS) que permite establecer los factores de riesgo ambientales para dicha enfermedad, como temperatura, humedad relativa y pluviometría. De esta manera se puede aplicar métodos de predicción y monitoreo de la leptospirosis (14).

### 2. 2. 2. PATOGÉNESIS

El conocimiento de los mecanismos de virulencia, patogénesis e inmunidad es indispensable para entender los aspectos clínicos, epidemiológicos y preventivos de la leptospirosis (2). Sin embargo, el mecanismo por el cual *Leptospira* causa enfermedad no está bien entendido (1).

La leptospirosis es el resultado de la interacción entre la bacteria y los animales hospedadores, por tanto intervienen factores relacionados con los dos. Para entender esto, es necesario analizar la serie de eventos que ocurren cuando *Leptospira* invade a organismo susceptible, probablemente se trata de mecanismos similares tanto para especies animales, como para reservorios y el ser humano. Todo se inicia con la entrada de la bacteria, posiblemente a través de pequeñas abrasiones o heridas en la superficie de la piel, luego pasa directo al torrente circulatorio o vía linfática de la conjuntiva, el tracto genital en ciertos animales, mucosa nasofaríngea probablemente a través de la placa cribiforme, a los

pulmones por medio de inhalación de aerosoles o por vía trans-placentaria. Es muy difícil el ingreso a través de piel intacta u otras mucosas (2).

La habilidad que tiene *Leptospira* para sobrevivir en los tejidos es uno de sus mayores factores de virulencia. Luego que entra por medio de la piel, se encuentra expuesta a factores como el pH, potencial redox, electrolitos, ácidos grasos y pequeñas moléculas orgánicas que podrían ser utilizadas como nutrientes. A pesar de que, el nuevo microambiente es benéfico para el crecimiento de cualquier patógeno, en forma paralela se inicia la respuesta a la entrada a cargo del sistema inmunitario. Debido a que *Leptospira* tiene reducida su capacidad endotóxica, no causa una aguda respuesta inflamatoria en los tejidos (2).

Las leptospiras no patogénicas o avirulentas cuando llegan al torrente circulatorio son rápidamente destruidas por el complemento y por fagocitosis, las cepas patógenas pueden evadir la respuesta inmunitaria y crecen en forma exponencial en la sangre y tejidos. Esta replicación comienza a detenerse ante la presencia de inmunoglobulinas específicas en el plasma que disminuyen el número porque de lo contrario la alta concentración de bacterias en el organismo infectado puede conducir a la muerte, por ejemplo en condiciones de laboratorio concentraciones de  $10^{10}$  bacterias por hámster, produce la muerte en un tiempo de 72 h a 6 días por las lesiones producidas por la bacteria (2).

El tiempo que le toma a la bacteria desarrollar lesiones en el hospedador depende de la dosis o tamaño del inóculo, el nivel de virulencia, tasa de crecimiento, toxicidad y respuesta inmunitaria. Se piensa que en el medio ambiente (agua y suelo) la dosis infectiva es baja, y este es el principal factor que regula la duración del período de incubación (2).

En aquellos animales que no mueren en la fase aguda de la leptospirosis, la bacteria puede persistir en números bajos en tejidos y órganos inmuno-privilegiados a medida que van desapareciendo del torrente circulatorio. Estos sitios pueden ser: los túbulos renales, cerebro, cámara anterior del ojo y tracto genital, de esta manera se protege de la acción de los anticuerpos y puede mantenerse y crecer. En los túbulos renales la *Leptospira* migra a



través los espacios intersticiales hacia la superficie laminar del túbulo, de allí son excretadas a través de orina hacia el medio ambiente (2).

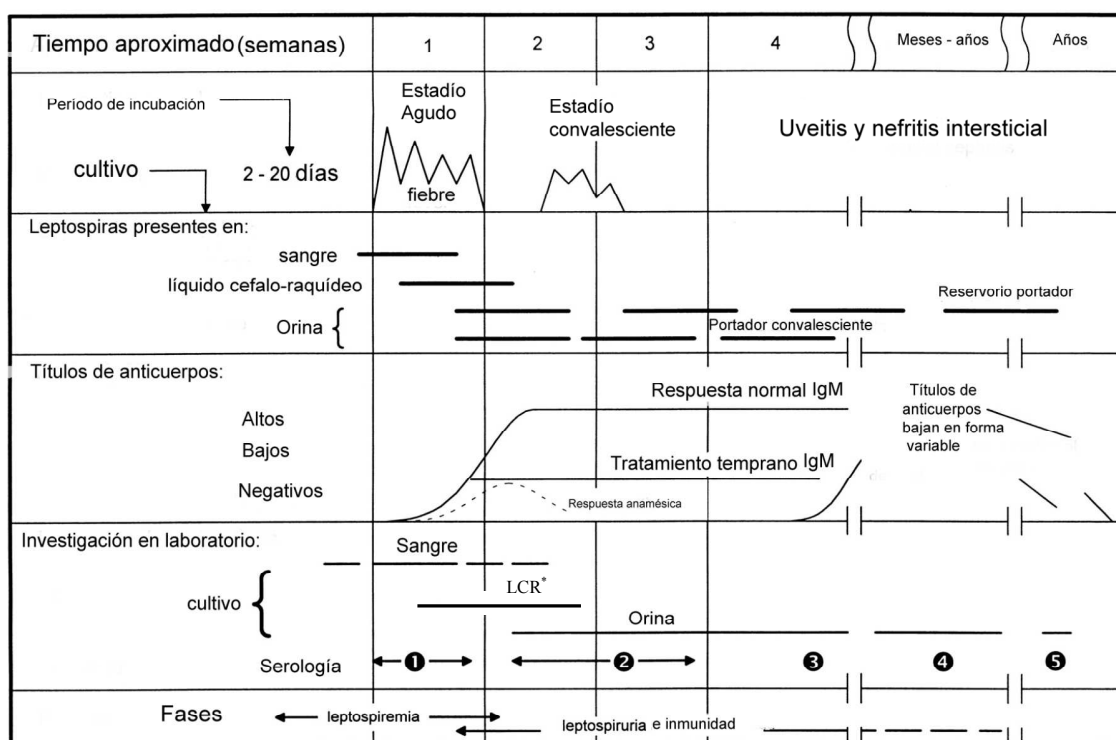
### **2. 2. 3. ASPECTOS CLINICOS**

La leptospirosis ha sido descrita como una zoonosis con una gran gama de manifestaciones clínicas. El espectro de la enfermedad puede ser muy amplio, y puede ir desde una infección subclínica hasta un síndrome severo caracterizado por infección en múltiples órganos y alta mortalidad. De igual manera la presentación de los síntomas es extremadamente amplia, donde el clásico síndrome de Weil representa la forma más severa de la enfermedad. Es importante considerar que las diversas manifestaciones clínicas podrían estar asociadas al serogrupo causante de leptospirosis (1).

La clínica de la enfermedad es bifásica conformada por una fase aguda o septicémica que se manifiesta luego de una semana de la infección y está seguida por una fase inmunológica caracterizada por la producción de anticuerpos y excreción de leptospiras por la orina (ver figura 1). La mayoría de complicaciones están asociadas con la localización de la bacteria en tejidos durante la fase inmune y esto se da en la segunda semana de la infección (1).

El período de incubación puede durar 2 o más de 30 días, pero generalmente se da entre 5 y 14 días. Todos los tipos de leptospirosis empiezan de igual manera, con una serie de síntomas como: dolor de cabeza, dolor muscular, escalofríos, fiebre, algunas veces acompañado de náusea con o sin vómito, efusión conjuntival, erupción cutánea, fotofobia y otros signos de meningitis que caracterizan a la primera fase de la enfermedad o leptospirosis anictérica (1). Posteriormente el curso de la enfermedad depende de la serovariedad que ha infectado, el tamaño de inóculo, nutrición del paciente y la disponibilidad de atención médica. Alrededor, del 5 al 15 % de pacientes con leptospirosis desarrollan la forma severa de leptospirosis, la mortalidad en estos casos es del 5 al 40% (1, 2).

La mortalidad en casos de leptospirosis anictérica es muy baja, sin embargo se ha reportado en China 2.4 % de muertes por hemorragia masiva pulmonar. De esto deriva la importancia del diagnóstico temprano y diferencial de otras enfermedades tanto virales como bacterianas asociadas a la clínica de la leptospirosis (1). La leptospirosis icterica es más severa y progresa rápidamente, con altos niveles de mortalidad. Entre el 5 y 10% de casos desarrollan este tipo de complicación, la ictericia no está asociada con necrosis hepática, por tanto la función normal del hígado se recupera luego de que cesa la infección. Las complicaciones son consecuencia de la naturaleza multisistémica de la leptospirosis. Una falla aguda renal (ARF) ocurre en 16 a 40% de casos (1). La incidencia de complicaciones oculares es variable, uveitis anterior tanto unilateral como bilateral puede ocurrir en pocos casos convalescientes de la fase aguda y se presenta en un tiempo que varía entre semanas hasta años. La mayoría de casos de uveitis podrían ser consecuencia de un fenómeno autoinmune (1).

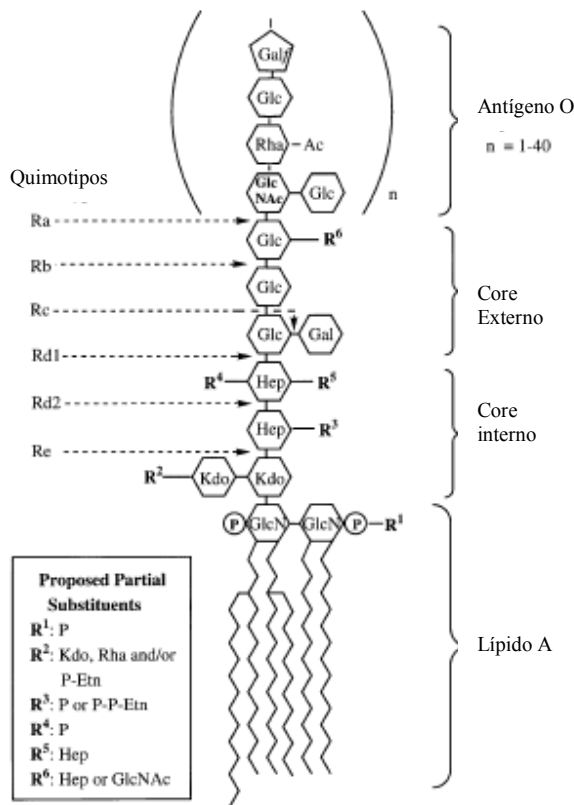


**Figura 1: Naturaleza bifásica de la leptospirosis. (\* Líquido Cefalo Raquídeo) Modificado de Levett**

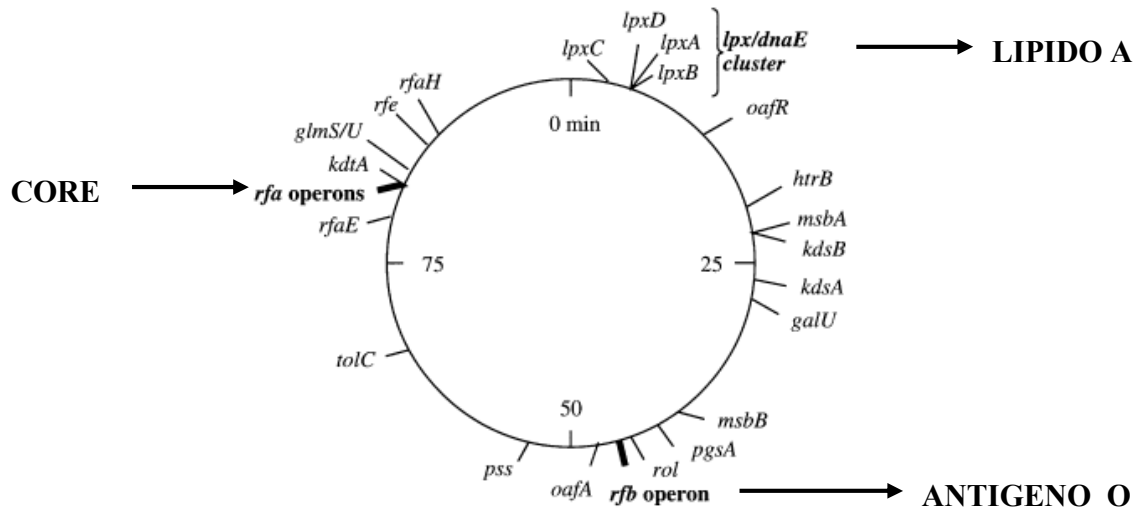
En cuanto a otras complicaciones, se encuentra la infección aguda durante el embarazo que ha sido reportada como causa de aborto en animales. La *Leptospira* ha sido aislada del líquido amniótico, placenta, y cordón umbilical. También se ha logrado aislar la bacteria de la leche materna en un caso donde la madre infectó a su hijo a través de la lactancia. Se ha reportados casos raros de complicaciones que incluyen accidentes cerebro vasculares, rabiomolisis, púrpura trombótica trombocitopénica, colecistitis aguda, eritema nodosum, estenosis aórtica, síndrome de Kawasaki, artritis reactiva, epididimitis, nervioplasia, hipogonadismo masculino y Síndrome de Guillain-Barré (1).

### **2. 3. LIPOPOLISACARIDO: Estructura y Síntesis**

Lipopolisacárido es un glicolípido inmunogénico que forma parte de la superficie de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Esta constituido por tres dominios unidos con enlaces covalentes: lípido A, la región central (core) y el antígeno O, ver figura 2 (10). Debido a la morfología de las colonias las bacterias tienen intacto su antígeno O se denominan lisas y las que carecen del mismo se conocen como rugosas. Los genes involucrados en la biosíntesis de LPS están localizados en varios operones, el operón *lpx/dnaE* codifica para la biosíntesis de lípido A, los operones *rfa* y *rfb* dirigen la síntesis del core y el antígeno O respectivamente como indica la figura 3 (10).



**Figura 2:** Esquema de la estructura molecular de LPS de *E. coli*.  
 Abreviaturas: GlcN (D-glucosamina); KDO (ácido 3-deoxi-D-mano-octulosónico); Hep (L-glicero-D-mano-heptosa); Glc (D-glucosa); Gal (D-galactosa); GlcNAc (N-acetil-D-glucosamina); Rha (L-ramnosa); Galf (D-galactofuranosa); P (fosfato); P-etn (fosfoetanolamina); P-P-etn (pirofosfoetanolamina). Tomado de Raetz C. 1996.



**Figura 3:** Localización de los genes involucrados en la biosíntesis de LPS. Genes y grupos de genes identificados en *E. coli* y *S. typhimurium*. Tomado de Raetz C. 1996.

### 2.3.1. LIPIDO A

Es un ancla hidrofóbica que puede separarse del resto de la molécula de LPS por hidrólisis ácida. Está constituido por un eje de disacáridos de glucosamina unidos por enlace  $\beta 1\text{'-}6$  que posteriormente es acilado, fosforilado y finalmente glicosilado. La estructura mínima de LPS requerida para el crecimiento de *E. coli* consiste de lípido A glicosilado con dos residuos de ácido 3-deoxy-D-manno-octulosónico (KDO). Contiene 24 carbonos quirales y esto favorece al reconocimiento por parte de varias proteínas. Debido a la conservación de estos centros quirales en la mayoría de bacterias Gram negativas se entiende la razón por la cual las células del sistema inmunitario pueden responder a concentraciones de LPS en el orden de picomoles (10).

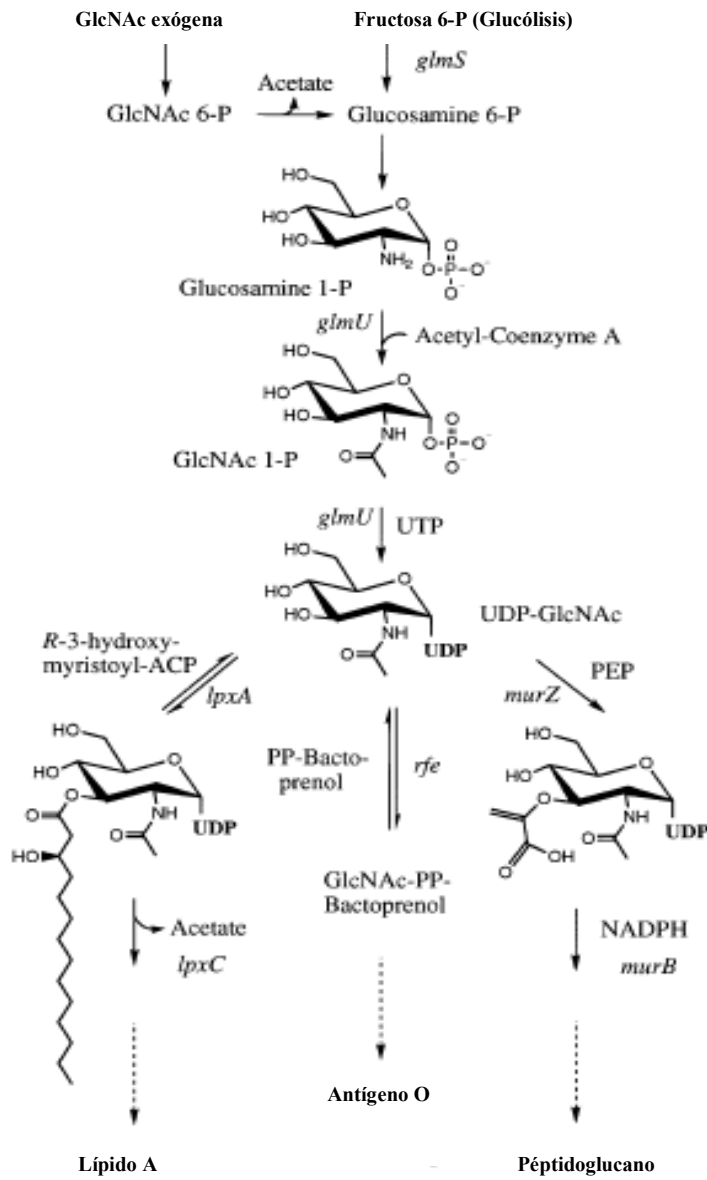
#### 2.3.1.1. BIOSINTESIS DE LIPIDO A

El lípido A es altamente conservado entre las bacterias Gram negativas y se conocen la mayoría de sus genes. El primer paso en la biosíntesis de lípido A es la formación de UDP-GlcNAc catalizado por una enzima codificada por el gen *glmU*. (fig. 4). Luego una enzima citoplasmática aciltransferasa codificada por *lpx A* reconoce el grupo OH del carbono 3 de la hexosa de UDP-GlcNAc e incorpora un R-3-hidroximiristato.

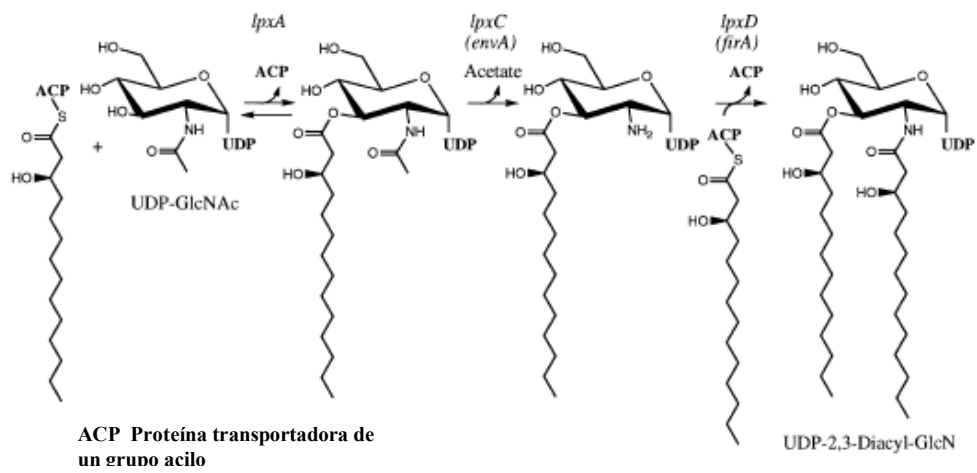
Luego una deacetilasa codificada por el gen *env A (lpxC)*, retira un grupo acetato, para que en el siguiente paso se incorpore un R-3-hidroximiristato al grupo  $\text{NH}_2$  para formar un UDP-2,3-diacilglucosamina, esta reacción es catalizada por una N-aciltransferasa producto del gen *firA (lpxD)* como indica la figura 5. Esta molécula constituye el inmediato precursor de lípido A por su extremo distal no reducido. Algunas moléculas rompen el enlace pirofosfato y se convierten en 2,3-diacilglucosamina-1P o denominado lípido X que es el monosacárido precursor de lípido A por su extremo proximal reducido. La formación de disacárido está catalizado por la enzima disacárido sintetasa producto del gen *lpxB*, que

forma un enlace  $\beta$  1'-6 entre UDP de UDP-2,3-diacilglucosamina y el carbono 6 de lípido X como indica la figura 6 (10).

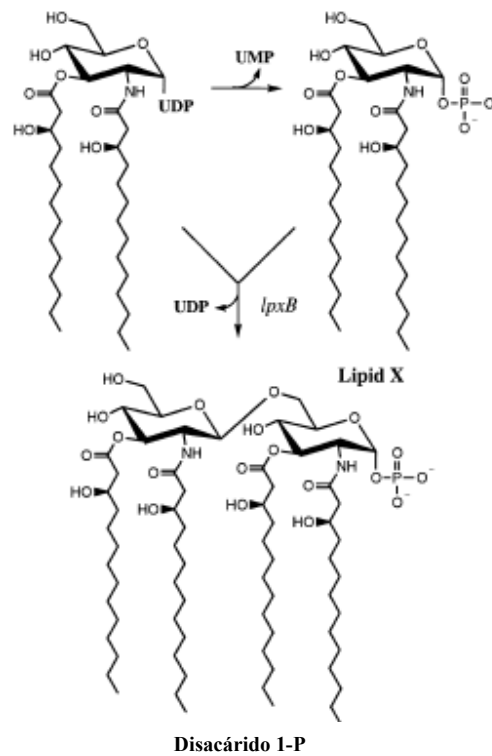
Luego una cinasa incorpora un grupo fosfato al carbono 4' y da lugar a lípido IV<sub>A</sub>, el gen que codifica para la cinasa es desconocido. A continuación una transferasa transfiere residuos KDO al grupo fosfato. Finalmente se produce la acilación tardía, en donde residuos de laurato y miristato son incorporados a KDO<sub>2</sub>-lípido IV<sub>A</sub> en sitios altamente conservados, detallado en la figura 7 (10).



**Figura 4:**  
**Biosíntesis y fraccionamiento de**  
**UDP-GlcNAc en *E. coli*. Tomado**  
**de Raetz C. 1996.**

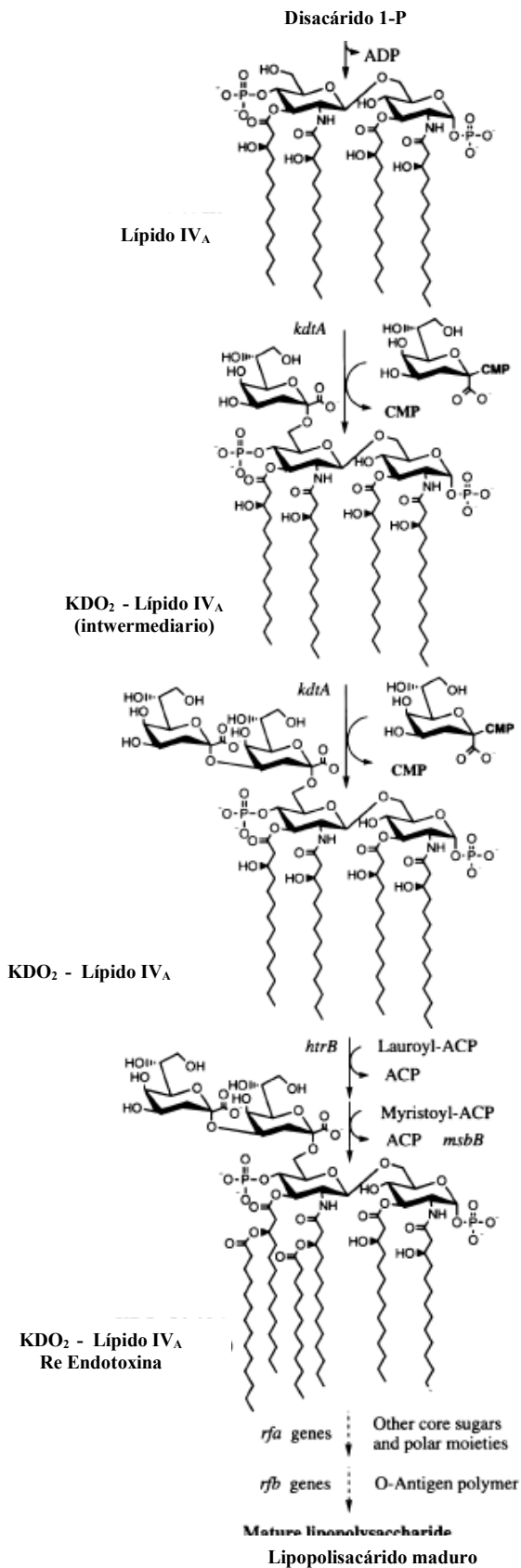


**Figura 5:**  
Tres reacciones iniciales en la biosíntesis de lípido A.  
Tomado de Raetz C. 1996.



**Figura 6:**  
Formación de lípido X y generación del enlace  $\beta$  1'-6 de lípido A. Tomado de Raetz C. 1996.





**Figura 7:**  
Biosíntesis de KDO<sub>2</sub>-lipido A ó LPS mínimo que requiere *E. coli* para crecer. La KDO transferasa es un simple polipéptido que adiciona dos residuos de KDO a lípido IV<sub>A</sub>. Tomado de Raetz C. 1996.

### 2. 3. 2. REGION CENTRAL (CORE)

La región central de LPS, conocida como core contiene azúcares inusuales como KDO y L-glicero-D-mano-heptosa y sustituyentes fosforilados. La mayor dificultad en el estudio de la estructura del core es su composición altamente heterogénea. En *E. coli* K12 por ejemplo, el core contiene 6 a 10 azúcares adicionados a dos residuos de KDO. Existe una limitación en el estudio de las enzimas que incorporan azúcares al core y otros sustituyentes a KDO, las razones son que las estructuras de los sustratos utilizados por las enzimas y los productos generados no están bien caracterizados, a esto se suma la carencia de sustratos sintéticos y la complejidad de la estructura del core (10).

#### 2. 3. 2. 1. BIOSÍNTESIS DEL CORE

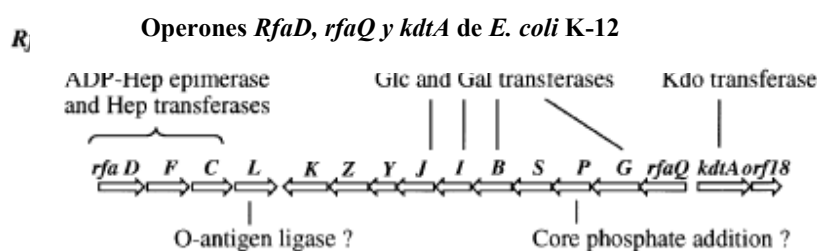
Los genes *rfaD*, *rfaC* y *rfaF* se piensa que codifican para ADP-heptosa epimerasa, primera heptosil tranferasa y segunda heptosil tranferasa respectivamente. A pesar que se ha comprobado que KDO<sub>2</sub>-lípidio IV<sub>A</sub> es aceptor de un grupo heptosil, la enzima ADP-heptosa ha sido caracterizada en forma incompleta.

Los genes *rfa* en *E. coli* y *Salmonella* son ligeramente diferentes entre sí. Debido a las limitaciones de ensayos enzimáticos disponibles no se ha asignado funciones bioquímicas a muchos genes del operón *rfa*. En *E. coli* la región *rfa* está formada por 14 genes organizados en dos operones que convergen en direcciones opuestas. Las funciones propuestas para cada gen están descritas en la figura 8 (10).

El operón grande *rfa* empieza con *rfaQ* que es regulado por el gen *rfaH* que se encuentra fuera del mismo y al parecer desempeña una función de antiterminación. El operón *rfa* pequeño empieza con *rfaD* y codifica cuatro genes que se expresan bajo el control de proteínas de estrés como factores sigma (sigma factors). La importancia fisiológica de la regulación del operón *rfa* no está bien clara (10).

De la mayoría de genes de la región *rfa* solamente *kdtA* (KDO transferasa) y *rfaL* (antígeno O ligasa putativa) tienen dominios transmembranales. Los otros genes *rfa* no codifican por

cadena hidrofóbica larga por tanto se podría proponer que se tratan de enzimas de membranas periféricas o citoplasmáticas. Todo el core es ensamblado en el lado citoplasmático de la membrana interna previo a la translocación a la superficie periplásmica y unión con el antígeno O. El rol que cumplen los genes *rfa Q, S, Y, Z* y *K* en *E. coli* y *Salmonella* no está descrito aún. Al parecer *rfaQ* codifica para una heptosil transferasa que une uno de los residuos del core. En *Salmonella typhimurium* el gen *rfaK* podría codificar para una enzima que une GlcNAc al core externo y este paso es requerido aparentemente para la subsecuente unión al antígeno O (10).



**Figura 8:**  
Ubicación de los genes dentro del operón *rfa*.  
Tomado de Raetz C. 1996.

La posible función de *rfa S* y *Z* está en la formación de un core alternativo llamado lipooligosacárido, cuya estructura exacta es desconocida y es incapaz de unirse al polímero del antígeno O. En el ensamblaje de Lípido A las enzimas actúan en secuencia, es decir, cada enzima puede actuar únicamente sobre el producto generado por la enzima que le precede en la ruta metabólica. Alternativamente, en la biosíntesis del core, la mayoría de azúcares son incorporados en forma secuencial, pero otros son incorporados en forma independiente. Por ejemplo la heptosa puede ser transferida a KDO<sub>2</sub>-lípido IV<sub>A</sub> ó KDO<sub>2</sub>-lípido A, en forma independiente de la acilación tardía (10).

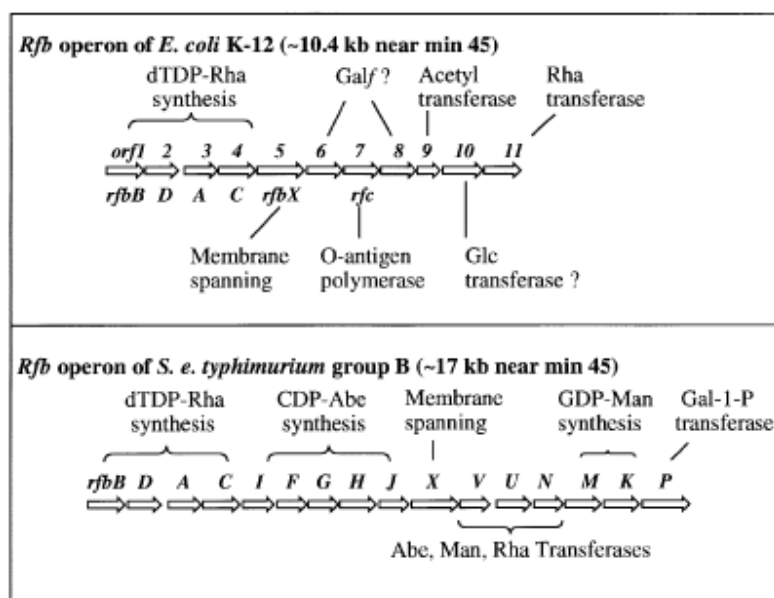
### 2.3.3. ANTIGENO-O

La estructura del antígeno O varía considerablemente dentro de las bacterias Gram negativas. Se han identificado alrededor de 160 diferentes rearrreglos químicos de antígeno O solamente en *E. coli*. La presencia de antígeno O en la superficie de la célula bacteriana

tiene relación con la virulencia bajo ciertas condiciones e incremento de la resistencia bacteriana a la destrucción mediado por el complemento. Los genes *rfb* codifican para la mayoría de enzimas requeridas para el ensamblaje de antígeno O. Estos genes han sido secuenciados en diferentes cepas de *Salmonella* y *E. coli* y otras bacterias Gram negativas como *Leptospira*. El contenido de CG difiere entre cepas (10).

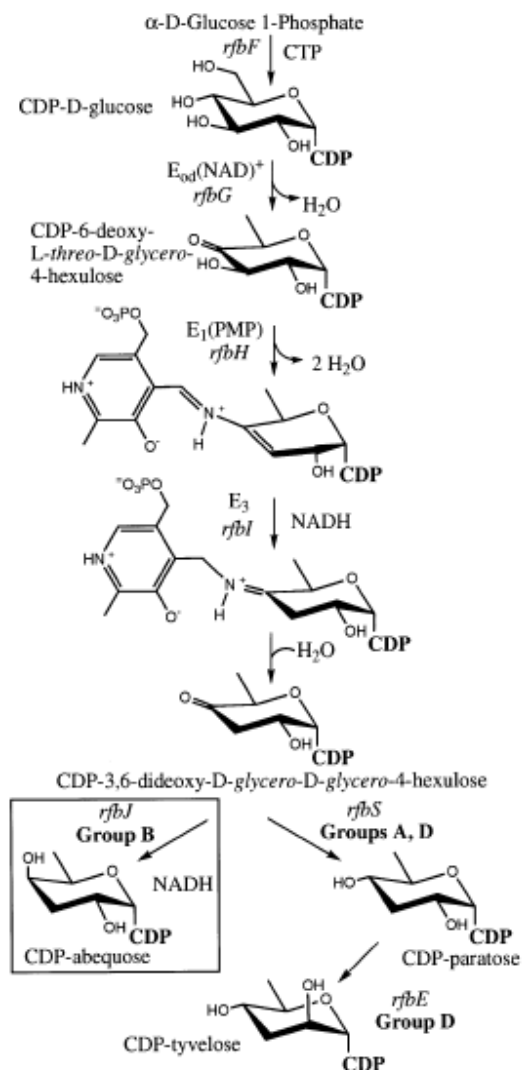
### 2.3.3.1. BIOSÍNTESIS DEL ANTIGENO O

La disponibilidad de enzimas para la construcción de oligosacáridos del antígeno-O facilita el estudio de su estructura y biosíntesis. Las enzimas que generan dTDP-ramnosa están codificadas por los cuatro primeros marcos de lectura abiertos del operón *rfb*, cuyas secuencias se encuentran relativamente conservadas, entre las bacterias. A continuación de los genes *rfb* (BDAC) se halla un grupo de genes (*rfb* IFGHI en *S. typhimurium*) que codifican para las enzimas que intervienen en la formación de 3,6 dideoxihexosa (ver figura 9) y estas secuencias son variables entre las bacterias Gram negativas. *E. coli* K12 carece de estos genes (10).



**Figura 9:**  
Organización y función de los genes en el operón *rfb* de dentro del operón *rfb* de *E. coli* K12 y *S. e. typhimurium*. Tomado de Raetz C. 1996.

Los genes *rfbH* (dehidrasa) y *rfbI* (reductasa) posiblemente intervienen en la deoxigenación y posterior reducción de la hexosa en el carbono 3 (ver figura 10).

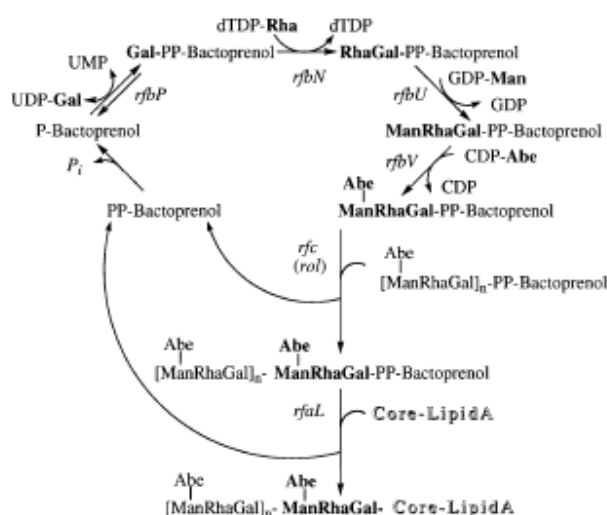


**Figura 10:**  
Síntesis de 3,6dideoxiazúcares. Se describe el rol de Piridoxamina-5-monofosfato (PMP) en la deshidratación y reducción del C3 de la hexosa. Tomado de Raetz C. 1996.

En la mitad del operón *rfb* se encuentra un grupo de genes *rfbX* que codifican para proteínas que tienen 12 segmentos transmembrana, que pueden tener un rol en el transporte, el análisis de la secuencia de estos genes no es conservada entre diferentes organismos. La parte final del operón *rfb* contiene un grupo de genes que codifican para enzimas que catalizan la formación de ciertos nucleótidos glicosilados como la GDP-manosa y

glicosiltransferasas que intervienen en la formación del oligosacárido que constituye el antígeno O. Estos genes son los responsables de la diversidad en la composición y configuración de oligosacáridos, por tanto difieren considerablemente entre bacterias Gram negativas (10).

La síntesis del antígeno O es independiente de la formación de lípido A y el core. La secuencia de reacciones para ensamblar una subunidad de oligosacáridos de antígeno se describe en la figura 11.



**Figura 11:**  
**Polimerización de las cadenas de oligosacáridos de antígeno O. Tomado de Raetz C. 1996.**

En *Salmonella typhimurium*, el ciclo de la formación del antígeno O se inicia con la transferencia de galactosa 1-fosfato de UDP-galactosa a bactoprenol fosfato catalizado por el producto del gen *rfbP* (*wbaP*). El producto bactoprenol pirofosfato-galactosa es aceptador de tres glicosilaciones catalizadas por enzimas transferasas codificadas por los genes *rfbN*, *rfbU* y *rfbV* (10).

La incorporación parcial de grupos acetil y glicosil al antígeno O se produce luego de la polimerización y los genes responsables de estas modificaciones tardías son *oafA* y *oafR* que se encuentran fuera del operón *rfb* (10).

### 2. 3. 3. 2. POLIMERIZACION DE ANTIGENO O

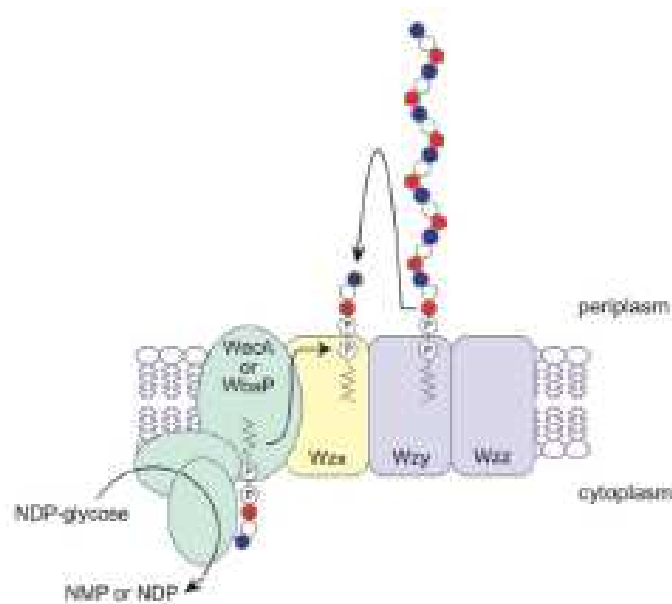
Un aspecto importante en la polimerización del antígeno O es la incorporación de repeticiones al extremo reducido de la cadena en crecimiento, de manera similar a la síntesis del peptidoglucano y esto constituye una ventaja para la polimerasa asociada a la membrana (*rfbC*) que no tiene que buscar el extremo de la misma. Todas las polimerasas de antígeno O son proteínas hidrofóbicas con al menos 12 segmentos transmembrana. Especies bacterianas que tienen entre 25 y 35 repeticiones son más frecuentes. Aquellas que tienen más de 35 son menos abundantes y polímeros con más de 40 unidades son no viables (10).

La síntesis de las unidades de antígeno O ocurre en la cara interna de la membrana citoplasmática. Posteriormente, estas unidades deben ser transferidas por un transportador lipídico al espacio periplásmico para ser ligadas al lípido A-core. Actualmente, se conocen tres mecanismos para ensamblar el antígeno O y se denominan: dependiente de Wzy, dependiente de transporte ABC y dependiente de sintetasa. Los dos primeros son las rutas metabólicas más utilizadas por las bacterias (29).

#### A) MECANISMO DEPENDIENTE DE Wzy

En *Salmonella entérica*, las repeticiones de unidades de azúcares son trisacáridos idénticos Manosa-Ramnosa-Galactosa, pero difieren en la presencia de sustituciones de dideoxihexosas (abecusosa) en alguno de los azúcares. A continuación, estas subunidades deben ser exportadas al sitio de polimerización en el lado periplásmico de la membrana citoplasmática. El grupo de enzimas que regula este proceso son: Wzx (flipasa) que transporta las unidades de antígeno O al espacio periplásmico, Wzy (polimerasa de antígeno O) que va incorporando las subunidades de azúcares al polímero de antígeno O y

finalmente *Wzz* (*clt/rol*) que distribuye en forma específica las subunidades de azúcares, actúa en íntima relación con *Wzy* modulando el tamaño de la cadena de azúcares (29). (ver figura 12)



**Figura 12:**  
**Ensamblaje de las cadenas de oligosacáridos de antígeno O**  
**utilizando la ruta dependiente de Wzy. Las subunidades son**  
**transportadas por Wzx al espacio periplásmico, Wzy**  
**polimeriza y Wzz modifica la la cadena de antígeno O**  
**Tomado de Raetz C. 2002.**

## **B) MECANISMO DEPENDIENTE DE TRANSPORTE ABC**

En este caso la elongación de la cadena de antígeno O ocurre progresivamente por la incorporación de azúcares. El sistema de transporte ABC está formado por *Wzm* y *Wzt* que transportan las unidades de azúcares al lado periplásmico de la membrana interna donde es ligado al lipidoA y core y translocado a la membrana externa, este proceso utiliza ATP como fuente de energía y no requiere polimerasas de antígeno O (29).

## **C) MECANISMO DEPENDIENTE DE SINTETASA**

Las sintetetas son enzimas glicosiltransferasas, que tienen la capacidad de sintetizar polímeros, pero no se entiende bien como se detiene la elongación de la cadena de antígeno O (29).



## 2. 4. ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE *LEPTOSPIRA*

La membrana externa de las espiroquetas está compuesta principalmente de fosfolípidos, proteínas de membrana externa (OMP) y en algunos sitios lipopolisacárido (LPS). Esta membrana forma una interfase entre la célula y su medio ambiente externo, a su vez actúa como una barrera selectiva que impide la entrada de ciertas moléculas y simultáneamente favorece el ingreso de nutrientes. La permeabilidad selectiva de la membrana externa está relacionada con las propiedades físico-químicas de la misma y la presencia de moléculas asociadas a la misma, de estas moléculas particularmente las que se encuentran expuestas en la superficie de la célula pueden establecer interacciones con el hospedador (25).

El suero de humanos y animales exhiben una actividad bactericida primaria a través del sistema de complemento. Las bacterias Gram negativas y dentro de ellas las espiroquetas patógenas han desarrollado múltiples estrategias para protegerse del complemento, utilizando LPS y OMPs. Generalmente promueven la resistencia al complemento previniendo la cascada de activación o bloqueando la formación del complejo de ataque de membrana, en *Borrelia* se conoce que evade la activación de la vía clásica del complemento promoviendo la inactivación de C<sub>3</sub>b por la fijación del factor H a la lipoproteína OspE ubicada en la membrana externa de *Borrelia*. El factor H controla la activación del complemento porque actúa como cofactor en la escisión de C<sub>3</sub>b, acelerando la desaparición de C<sub>3</sub> convertasa y previniendo su formación por competición con el factor B (25, 36).

### 2. 4. 1. PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA

Las porinas son proteínas integrales de la membrana externa, que generan canales transmembrana. Se dividen en tres clases de acuerdo a su función: a) poros de difusión general, b) canales específicos contienen sitios de unión con ciertos solutos y c) canales de transporte activo (34). Las pertenecientes a las espiroquetas se clasifican en dos tipos: las que tienen un solo y pequeño canal de conducción como OmpL1 de *Leptospira* y las que tienen un canal largo de conducción. La presencia de porinas con diferente selectividad va

a permitir a las bacterias adaptarse a diferentes medios, como es el caso de *Leptospira* que vive en dos ambientes diferentes un acuático y otro dentro del hospedador, además las porinas pueden jugar un rol muy importante en la inmunidad de la infección (25).

La identificación del grupo de proteínas de membrana externa que se encuentran en la superficie de *Leptospira* es muy importante para la investigación de antígenos que podrían proveer protección frente a la infección. La membrana externa de *Leptospira* está constituida por unas pocas proteínas transmembranales integrales, siendo una de ellas una porina trimérica OmpL1 que es la única que ha sido identificada y caracterizada. Además, la membrana contiene una serie de lipoproteínas, las cuales se encuentran ancladas a la membrana a través de su extremo N-terminal. Algunas de estas, pueden estimular una inmunidad parcial en modelos animales, por ejemplo LipL32 protege parcialmente de la infección aguda en ardillas, mientras que LipL41 muestra inmunoprotección en sinergismo con OmpL1, es decir que no muestra protección por si sola. Otra lipoproteína de interés es LipL36, la cual se expresa cuando la bacteria crece en medio de cultivo y no cuando está infectando al hospedador (18, 23, 25).

Las tres mayores proteínas en orden de abundancia en la superficie de la célula son LipL32, LipL21 y LipL41. Encontrándose dos isoformas de LipL32 cuya significancia biológica es todavía desconocida. A pesar de, que las proteínas de membrana externa de *Leptospira* solamente han conferido una parcial protección a la infección, constituyen potenciales candidatas para el desarrollo de vacunas contra leptospirosis, puesto que todas estas proteínas son altamente conservadas en todas las especies patógenas de *Leptospira*. La superficie de *Leptospira* es muy importante, si se considera la interacción de la bacteria con las células y tejidos del hospedador dentro del contexto de la patogénesis e inmunidad de la enfermedad (23, 24).

La expresión de las proteínas de superficie de *Leptospira* puede variar según las condiciones, existe evidencia de que la composición de proteínas es diferente en bacterias recién asiladas del hospedador. Recientemente, se ha descrito una familia de proteínas expuestas en la superficie leptospiral que tienen una organización estructural similar a

adhesinas bacterianas, estas proteínas tienen dominios repetidos parecidos a los de inmunoglobulinas y por esta razón se han designado como proteínas Lig (leptospiral Ig-like). Lig A y Lig B se encuentran insertadas en la membrana externa, y se ha observado que reducen su expresión cuando *Leptospira* es cultivada *in vitro*, al parecer la expresión de estas proteínas está relacionada con la osmolaridad y la pérdida de virulencia de la bacteria durante el cultivo en laboratorio. Actualmente, se llevan a cabo estudios para determinar el papel que cumplen estas proteínas en la adhesión de la bacteria a las células del hospedador y la invasión durante la patogénesis de la leptospirosis (23, 25).

#### **2. 4. 2. LIPOPOLISACARIDO DE *LEPTOSPIRA***

Lipopolisacárido es el antígeno dominante de la superficie de los géneros *Leptospira* y *Brachyspira* a diferencia de *Treponema* y *Borrelia* que no tienen LPS en su membrana externa. La composición de lipopolisacárido de *Leptospira* es similar al de otras bacterias Gram negativas, sin embargo, tiene una actividad endotóxica reducida, porque carece del gen *lpxA* que codifica por una enzima UDP-N-acetilglucosamina-3-O-acetiltransferasa que cataliza el primer paso para la biosíntesis de lípido A (5). La existencia de más de 200 serovariedades da amplia evidencia de la diversidad y heterogeneidad de la estructura de LPS entre leptospiros. (1, 5, 6).

Durante la infección la inflamación es consecuencia de la respuesta inmune innata y adaptativa, que se activa en respuesta a la presencia de productos bacterianos como LPS, lipoproteínas, peptidoglucano y ADN. Al parecer las lipoproteínas juegan un rol dominante en la activación de la inmunidad innata en las infecciones espiroquetales (25). La inmunidad humoral desempeña un papel muy importante en la leptospirosis, y LPS de *Leptospira* es un antígeno que induce inmunidad protectora. Estudios realizados por Jost y colaboradores (12) han demostrado que la presencia de anticuerpos monoclonales contra LPS puede proteger de la infección con cepas de *Leptospira* patógena. La forma de acción de los anticuerpos puede ser a través de la activación del complemento, por opsonización ó por fagocitosis mediada por macrófagos. (5, 14). El sistema del complemento es uno de los más versátiles componentes del sistema inmunitario (36). El elemento más abundante y

central es  $C_3$  y la ruptura de esta molécula constituye el centro de todos los fenómenos mediados por el complemento (37).  $C_3b$  es un ligando para la adhesión del complejo inmune en la vía clásica y alternativa del complemento. Se conoce que muchos microorganismos pueden interferir con el complemento a nivel de  $C_3b$ , por ejemplo *Trypanosoma cruzi* produce enzimas que aceleran la destrucción de  $C_3$  convertasa, *Herpes virus* inactiva a  $C_3b$  o *Streptococcus pyrogenes* que pega factores reguladores del complemento (factor H) del hospedador a su superficie (36). Se conoce que *Leptospira* puede sobrevivir en los tejidos gracias a su capacidad para neutralizar la acción del complemento, pegándose a  $C_3$  e interfiriendo en la activación del complemento (13).

La estrategia propuesta para el control y prevención de leptospirosis es el desarrollo de vacunas. Actualmente, existen vacunas constituidas por células inactivadas. Sin embargo, dichas vacunas no inducen protección por largo tiempo y tampoco proveen inmunidad contra todos los serovares existentes. El conocimiento de las proteínas antigénicas conservadas entre todas las serovares patógenas, y el entendimiento del ensamblaje de LPS de *Leptospira* contribuirán al desarrollo de vacunas más eficientes (19).

Se conoce muy poco acerca de la química y genética del LPS de *Leptospira* comparado con lo que se sabe de otras bacterias Gram negativas como las pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. La composición de LPS ha sido investigada en pocas cepas y el mayor componente de azúcares está formado por: ramnosa, galactosa, arabinosa y xilosa, cuyas proporciones varían entre cepas (5). Es inusual que *Leptospira* pueda utilizar carbohidratos exógenos como fuente de carbono. Como consecuencia de esto, todos los azúcares que incorpora a su LPS son sintetizados *de novo*. El ensamblaje de los azúcares que conforman este polímero llamado LPS se lleva a cabo gracias a enzimas que actúan en forma secuencial (5).

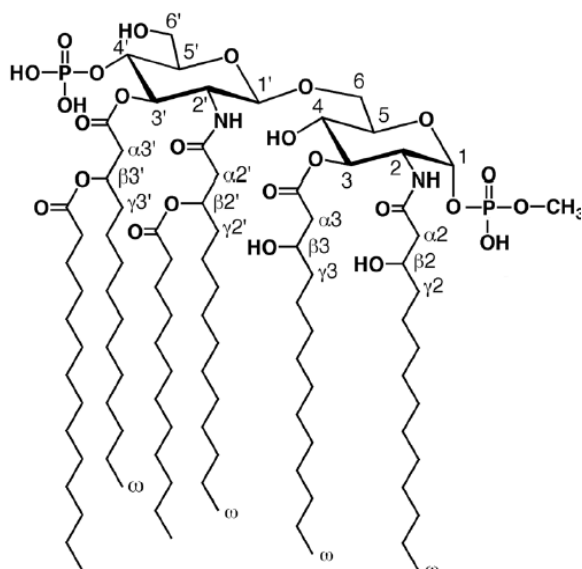
Al igual que otras bacterias, los genes que codifican las enzimas para la biosíntesis de antígeno O están localizados en el locus *rfb* (18). Tanto los genes del antígeno O como los genes ortólogos *lpx* de *E. coli* se han encontrado en los genomas secuenciados de algunas serovariedades de *Leptospira* (15, 18).

### 2. 4. 2. 1 LIPIDO A DE *LETOSPIRA*

En *E. coli* el lípido A es un disacárido de glucosamina unido por enlace  $\beta$  1-6, fosforilado en las posiciones 1 y 4' y posteriormente acilado con cadenas de R-3-hidroximiristato en las posiciones 2 – 3 y 2'-3'. Finalmente, ocurre una acilación secundaria en las posiciones 2'y 3' que incorpora cadenas de ácido laúrico y mirístico respectivamente (15).

La elucidación de la estructura de lípido A en *Leptospira interrogans* se logró gracias a la técnica de resonancia magnética nuclear (NMR) y análisis bioquímico. Se trata de un dímero  $\beta$ 1-6 glucosamina análogo que corresponde a 2,3-dideoxy-D-glucopiranososa (GlcN3N) que es acilado con cadenas de R-3-hidroxilaurato en las posiciones 3 y 3' y con R-3-hidroxi palmitato en las posiciones 2 y 2' como indica la figura 13. (15, 17)

La presencia de un motivo fosforilado metilado en *Leptospira interrogans* es el responsable de esta forma inusual de lípido A comparado con *E. coli*, y la significancia de esta estructura es desconocida (15). El receptor TLR4 (Toll Like Receptor) es el factor más importante para el reconocimiento de LPS en bacterias Gram negativas y TLR2 es el receptor dominante en microorganismos Gram positivos que reconoce peptidoglucano (16). El LPS atípico de *Leptospira* activa a TLR2 y es el componente principal de la respuesta inmune innata (16).



**Figura 13: Estructura de Lípido A de *Leptospira*. Tomado de Hinckley M. et al. (2005).**

#### 2. 4. 2. 2 ANTIGENO O DE *LEPTOSPIRA*

Se conoce que el mayor componente del antígeno O de *Leptospira* es ramnosa, encontrándose alrededor del 45 %. Los genes que catalizan la síntesis del antígeno O son los correspondientes al operón *rfb*, sin embargo, el orden difiere comparado con *Salmonella* y *E. coli*. Los genes *rfb CDBA* codifican para la síntesis de dTDP-ramnosa a partir de glucosa 1 fosfato (9). El operón *rfb* de *Leptospira* comprende 31 marcos de lectura abiertos (*orfs*) que transcriben en la misma dirección, también dispone de *orfs* adicionales que codifican para enzimas del tipo glucosiltransferasas y proteínas que intervienen en el transporte a través de la membrana y ensamblaje de las subunidades del antígeno O (11, 29).

La similitud genética encontrada en el locus *rfb* de dos subtipos del serovar Hardjo, Hardjobovis y Hardjoprajitno coincide con la antigenicidad de su LPS, indistinguible por métodos serológicos, a pesar de que pertenecen a dos especies diferentes de *Leptospira*. Este hallazgo sugiere que la base genética para las diferencias serológicas entre serovares, está relacionada con la presencia de genes específicos del operón *rfb* que regulan la biosíntesis de azúcares, organización y ensamblaje del antígeno O (6, 7)

A continuación, la tabla 1, describe los genes que intervienen en la síntesis del antígeno O de *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjobovis, la posible función de cada gen y la homología con los genes de otras bacterias Gram negativas.

**Tabla 1. Proteínas del operón *rfb* de *L. borgpetersenii* sv Hardjobovis (Modificado de Kalambaheti et al. 1999)**

<b>ORF (residuos)</b>	<b>Función putativa</b>	<b>Proteínas relacionadas</b>	<b>% identidad (similitud)</b>
OrfH1 (301)	Glicosiltransferasa	EpsI, <i>Streptococcus thermophilus</i> TrsB, <i>Yersinia enterocolitica</i>	28 (53) 20 (47)
OrfH2 (381)	Desconocida	WbpG, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44 (66)
OrfH3 (204)	Amidotransferasa (biosíntesis de histidina)	His5 or HisH, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> His5, <i>Haemophilus influenzae</i>	42 (63) 38 (61)
OrfH4 (254)	Ciclasa (biosíntesis de histidina)	His6 ó HisF, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> His6, <i>Lactobacillus lactis</i>	46 (69) 41 (59)
OrfH5 (360)	Glicosiltransferasa	RfpB, <i>Shigella dysenteriae</i> RfbF, <i>Klebsiella pneumoniae</i>	22 (49) 22 (49)
OrfH6 (332)	Biosíntesis de azúcares (dehidratasa)	Gdh, <i>Saccharopolyspora erythraea</i> TylA2, <i>Streptomyces fradiae</i> RfbB, <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Gmd, <i>Escherichia coli</i>	33 (52) 31 (51) 31 (48) 28 (47)
OrfH7 (237)	Biosíntesis de azúcares	Sll1558, <i>Synechocystis</i> sp. Mpg1, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36 (61) 30 (56)
OrfH8 (281)	Biosíntesis de azúcares (epimerasa)	GalE, <i>Methanococcus jannaschii</i> ExoB, <i>Rizobium leguminosarum</i> GalE, <i>Arabidopsis thaliana</i>	32 (57) 33 (56) 30 (54)
OrfH9 (298)	Biosíntesis de azúcares (oxidoreductasa)	Orf8, <i>A. Actinomycetes comitans</i> RmlD, <i>Streptococcus mutans</i>	26 (51) 26 (45)
OrfH10 (336)	Biosíntesis de azúcares (epimerasa)	Cap8E, <i>Staphylococcus aureus</i> Cap5E, <i>Staphylococcus aureus</i> TrsG, <i>Yersinia enterocolitica</i> WbpM, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65 (80) 65 (80) 31 (56) 32 (58)
OrfH11 (375)	Biosíntesis de azúcares (epimerasa)	Cap5G, <i>Staphylococcus aureus</i> Cap8G, <i>Staphylococcus aureus</i> Cap5P, <i>Staphylococcus aureus</i> WlbD, <i>Bordetella pertussis</i> WbpI, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> RffE, <i>Escherichia coli</i>	53 (72) 53 (72) 27 (52) 33 (58) 34 (60) 27 (49)

OrfH12 (408)	Glucosiltransferasa	Cap8L, <i>Staphylococcus aureus</i> Cap5L, <i>Staphylococcus aureus</i>	21 (49) 22 (49)
<b>ORF (residuos)</b>	<b>Función putativa</b>	<b>Proteínas relacionadas</b>	<b>% identidad (similitud)</b>
OrfH13 (421)	Und-PP- glucosiltransferasa	Cap8M, <i>Staphylococcus aureus</i> Cap5M, <i>Staphylococcus aureus</i> GumD, <i>Xhantomona campestris</i> WcaJ, <i>Escherichia coli</i> RfbP, <i>Anabaena</i> sp. RfbP, <i>Salmonella typhimurium</i>	43 (62) 43 (62) 28 (52) 32 (62) 33 (57) 25 (54)
OrfH14 (433)	Proteína de membrana	No hay homólogo	
OrfT1 (265)	IS3-como transposasa	IS402 transposasa, <i>Burkholderia cepacia</i>	35 (58)
OrfH15 (447)	O-antígeno flipasa	Wzx, <i>Yersinia enterocolitica</i>	31 (59)
OrfH16 (365)	Desconocida	No hay homólogo	
OrfH17 (312)	Desconocida	No hay homólogo	
OrfH18 (390)	Biosíntesis de azúcares	YfnF, <i>Bacillus subtilis</i> YfnD, <i>Bacillus subtilis</i>	27 (58) 30 (56)
OrfH19 (150)	Biosíntesis de azúcares (isomerasa)	Sin nombre <i>Streptomyces fradiae</i> Orf15x4, <i>Vibrio anguillarum</i>	39 (65) 42 (64)
OrfH20 (363)	Biosíntesis de azúcares (aminotransferasa)	TylB, <i>Streptomyces fradiae</i> Eryc1, <i>Saccharopolyspora erythraea</i> Orf41x4, <i>Vibrio anguillarum</i>	40 (60) 39 (58) 50 (69)
OrfH21 (251)	Glicosiltransferasa	EpsI, <i>Streptococcus thermophilus</i> TrsB, <i>Yersinia enterocolitica</i>	23 (51) 25 (51)
OrfH22 (281)	Glicosiltransferasa	EpsI, <i>Streptococcus thermophilus</i> TrsB, <i>Yersinia enterocolitica</i>	28 (52) 23 (49)
OrfH23 (586)	Glicosiltransferasa	Y4gI, <i>Rhizobium</i> sp. EpsI, <i>Streptococcus thermophilus</i> Cps14J, <i>Streptococcus pneumoniae</i>	25 (49) 25 (53) 25 (52)



OrfH24/ RmlC (186)	Biosíntesis de Ramnosa	RmlC, <i>Leptospira interrogans</i> RfbC, <i>Shigella flexneri</i> Y4gL, <i>Rhizobium</i> sp.	89 (94) 48 (65) 47 (66)
OrfH25/ RmlD (306)	Biosíntesis de Ramnosa	RmlD, <i>Leptospira interrogans</i> RfbD, <i>Shigella flexneri</i> Y4gG, <i>Rhizobium</i> sp.	85 (93) 32 (54) 35 (55)
<b>ORF (residuos)</b>	<b>Función putativa</b>	<b>Proteínas relacionadas</b>	<b>% identidad (similitud)</b>
OrfH26/ (349)	Biosíntesis de Ramnosa	RmlB, <i>Leptospira interrogans</i> RmlB RfbB, <i>Shigella flexneri</i> Y4gF, <i>Rhizobium</i> sp.	92 (96) 56 (70) 55 (70)
OrfH27/ (294)	Biosíntesis de Ramnosa	RmlA, <i>Leptospira interrogans</i> RmlA RfbA, <i>Shigella flexneri</i> Y4gH, <i>Rhizobium</i> sp.	97 (97) 66 (82) 68 (79)
OrfH28 (324)	Biosíntesis de Ramnosa	OrfE, <i>Leptospira interrogans</i> WbbL, <i>Serratia marcescens</i> Cps19bQ, <i>Streptococcus pneumoniae</i> Cps19fH, <i>Streptococcus pneumoniae</i>	86 (93) 28 (49) 25 (51) 20 (43)
OrfH29 (303)	Biosíntesis de Ramnosa	RfbF, <i>Leptospira interrogans</i> RfbQ, <i>Shigella dysenteriae</i>	89 (94) 33 (57)
OrfH30 (282)	Biosíntesis de Ramnosa	WbbL, <i>Serratia marcescens</i> Cps19bQ, <i>Streptococcus pneumoniae</i> Cps19fH, <i>Streptococcus pneumoniae</i> OrfH28, <i>Leptospira borgpetersenii</i>	34 (56) 27 (53) 19 (50) 25 (48)
OrfH31 (464)	Proteína Transportadora	HP0214, <i>Helicobacter pylori</i> NadC1, <i>Oryctolagus cuniculus</i>	34 (62) 32 (60)
OrfT2 (364)	IS/533 transposasa	serovar Tarassovi serovar Hardjobovis	98 (100) 97 (99)

### 3. MATERIALES Y METODOS

**3. 1. Bacterias y Métodos de cultivo:** Una cepa de *Leptospira interrogans* serovar Lai fue obtenida del laboratorio de leptospirosis del Royal Tropical Institute de Holanda, gracias a una gentileza del Dr. Rudy Harstkeerl. Las bacterias fueron cultivadas por 14 días a una temperatura de incubación de 30°C en el medio de Ellinghausen y McCullough modificado por Johnson y Harris (EMJH) que es el más ampliamente usado, porque contiene Tween 80 y suero de albúmina bovina (2).

**3. 2. Clonación de la cepa de *Leptospira interrogans* serovar Lai:** Con el propósito de aislar una sola célula de *Leptospira* y descartar contaminación del cultivo para iniciar el estudio Se dispuso de un cultivo de *Leptospira* de 14 días y se transfirió 1 ml del mismo a un tubo que contenía 9 ml de medio EMJH, se homogeneizó y se realizó la transferencia de 1 ml de este tubo a un segundo tubo con 9 ml de medio y se repitió esta secuencia hasta obtener un total de 10 tubos, (diez diluciones). Se incubó a 30°C por 14 días, se seleccionó el último tubo donde existió crecimiento y se sembró en medio EMJH semisólido con una concentración de 0.5% de agar, posteriormente se congeló la cepa clonada (3).

**3. 3. Anticuerpos:** El anticuerpo monoclonal F70C711 y los anticuerpos policlonales para los serogrupos Icterohaemorrhagie, Pomona, Gripothyphosa, Canicola y Bratislava fueron obtenidos en el Royal Tropical Institute (KIT) (3).

**3. 4. Selección de la cepa mutante:** Un cultivo de 10 ml de *Leptospira interrogans* serovar Lai (cepa clonada) fue tratado con 1 ml de anticuerpo monoclonal F70C711 (esterilizado por filtración a través de un filtro Millipore™ de 0.22 µM) e incubado a 30°C por una semana. Por efecto de la reacción entre antígeno y anticuerpo las bacterias

aglutinaron y precipitaron al fondo del tubo. Las células con mutaciones espontáneas en la región del antígeno O no aglutinaron en presencia del anticuerpo y se mantuvieron en el sobrenadante. Se tomó un mililitro del mismo y se sembró en 10 ml de medio EMJH, que contenía la misma concentración de anticuerpo. Este proceso se repitió cinco veces más hasta que no se visualizó aglutinación del cultivo (19).

**3. 5. Test de Aglutinación Microscópica (MAT):** Esta técnica es un método estándar para el diagnóstico de leptospirosis. Primero, se seleccionó una placa de microelisa y se colocó 50 µl de cultivo de *Leptospira* en cada uno de los pocillos, los pozos de la primera columna fueron considerados como controles del test. Luego, se incorporó 40 µl de cultivo a los pozos de la segunda columna y 10 µl de anticuerpo (se utilizaron diferentes anticuerpos para realizar esta prueba), obteniendo una dilución 1:10. A continuación se transfirió 50 µl de los pozos de esta columna a la siguiente, se homogeneizó bien y se continuó con este procedimiento hasta la columna 12, donde se descartó los 50 µl finales, con lo cual se obtuvo una serie de diluciones, que se indica en el Anexo 1. Se agitó cuidadosamente la placa, se cubrió las tiras con Parafilm™ y se incubó a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, se tomó 10 µl de cada pozo de cada tira en un portaobjetos y se observó bajo el microscopio de campo oscuro, con el lente 40X. Se cuantificó la aglutinación bacteriana y se comparó con el control. Para el cálculo del título de anticuerpo, se consideró el último pozo donde la aglutinación fue aproximadamente del 50 por ciento (3).

**3. 6. Extracción de ADN de *Leptospira*:** Se utilizó DNAzol™ Gibco, New York, USA. y de acuerdo con las instrucciones del fabricante, un volumen de 20 ml de cultivo de *Leptospira* de 14 días ( $10^7$  cél/ml) fue centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos, luego se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 20 ml de agua destilada estéril pH 7.2, se realizó una segunda centrifugación y el pellet fue resuspendido en 1 ml de agua destilada estéril y transferido a un microtubo para ser centrifugado por última vez bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. El precipitado fue resuspendido en 100 µl de agua y se adicionó 900 µl de reactivo DNAzol™ Gibco, New York, USA, se homogeneizó bien la mezcla y finalmente se añadió 500 µl de etanol absoluto, se agitó suavemente y con la ayuda de una punta de micropipeta se enrolló los delgados filamentos de ADN extraído y

fueron transferidos a un microtubo que contenía 1 ml de etanol al 70%, consecutivamente fue centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante, el pellet de ADN fue disuelto en volúmenes entre 50 y 100  $\mu$ l de NaOH 8Mm.

**3. 7. Fragmentación de ADN utilizando la enzima de restricción *EcoR1*:** Se preparó una reacción de 20  $\mu$ l, constituida por 15  $\mu$ l de ADN de *Leptospira*, 2  $\mu$ l de Buffer H®, 2  $\mu$ l de BSA al 10 % y 1  $\mu$ l de *EcoR1*, se incubó a 37°C por 24 horas, siguiendo las instrucciones del fabricante (3).

**3. 8. Electroforesis de ADN:** Se preparó un gel al 1% de agarosa y 0.1% de bromuro de etidio. Las muestras de las reacciones con enzima de restricción fueron tratadas con Buffer de Carga GIBCO™, New York, USA, se tomó 20  $\mu$ l de la mezcla, se cargó en el gel y se corrió por una hora a 70 V. A continuación se sometió al gel bajo luz UV para tomar una fotografía.

**3. 9. Extracción de Lipopolisacárido de *Leptospira*:** Se cultivaron las dos cepas, normal y mutante en 100 ml de medio EMJH ( $10^7$  cél/ml), a 30°C durante 14 días. Luego se centrifugó a 6000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante. A continuación se lavó con agua estéril y se resuspendió en un volumen final de 1 ml. Se transfirió a microtubos, se centrifugó a 6000 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 700  $\mu$ l de agua y se adicionó 350  $\mu$ l de sample buffer (SDS, glicerol,  $\beta$ -mercaptoetanol, Tris y azul de bromo fenol). A esta solución se colocó 2  $\mu$ g de proteinasa K y se dejó a 60°C toda la noche, al siguiente día las muestras conservadas a -20°C para posteriormente correr una electroforesis SDS-PAGE (20).

**3. 10. Electroforesis de proteínas:** Se preparó el gel de acrilamida, siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (21) las condiciones de corrida fueron 50 mA y 300 V por un tiempo aproximado de 4 horas. Para lograr una mejor resolución de bandas se preparó un gel de poliacrilamida de gradiente de concentración de 6 a 15% de acrilamida.

Las muestras de extracción de LPS fueron hervidas por 5 minutos, al igual que el estándar de tamaño de proteínas GIBCO™ New York, USA, luego se procedió a cargar en las ranuras del gel, 2  $\mu$ l de estándar y 50  $\mu$ l de 6 muestras alternando entre las procedentes de la

cepa silvestre y la mutante, en la primera mitad del gel, se dejó un espacio de 2 ranuras y se cargó siguiendo la misma secuencia en la segunda mitad del gel. El objetivo de esta organización de muestras fue dividir el gel en dos partes iguales de tal manera, que la primera fue teñida con nitrato de plata y la segunda fue utilizada para el ensayo de Western blot.

**3. 11. Tinción de LPS:** Para este procedimiento se usó un protocolo previamente descrito por Hitchcock y Brown (20). El gel obtenido de la electroforesis fue colocado en una solución fijadora (25% isopropanol y 7% ácido acético), durante toda la noche. Al día siguiente se oxidó en una solución constituida por 1,05 g de ácido Per Iódico, 4 ml de solución fijadora y 150 ml de agua destilada, por 10 minutos, luego se lavó con agua destilada, 8 veces con intervalos de 30 minutos. A continuación, se puso el gel en una solución formada por 28 ml de NaOH 0.1N, 1 ml NH<sub>3</sub> concentrado, 5 ml de AgNO<sub>3</sub> al 20% y 115 ml de agua destilada, por 20 minutos. Luego se realizó una serie de ocho lavados con agua destilada, cada 30 minutos. Finalmente, se reveló con una solución que contenía 50 mg de ácido cítrico y 0.5 ml de formaldehído al 37% en 200 ml de agua destilada, se mantuvo en agitación continua hasta que se visualizaron las bandas teñidas con plata, para detener la reacción se utilizó una solución al 7% de ácido acético (20).

### **3. 12. Análisis de Western blot:**

Luego de finalizada la electroforesis se extrajo el gel y se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de SDS (Sodium Dodecil Sulfato). A continuación se armó el equipo para realizar la transferencia y se colocó el gel sobre la membrana de nitrocelulosa entre dos papeles absorbentes, asegurando que no queden espacios entre el gel y la membrana. Las condiciones de transferencia fueron 300 mA y 50 V por un tiempo de 2 horas. La membrana fue colocada en la solución bloqueante [Buffer 1 (100 mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5, 0.1 % de leche descremada)] durante 2 horas, a continuación se adicionó el anticuerpo monoclonal F70C711 sobre la solución bloqueadora en una concentración 1:1000 y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora con agitación continua. Después de ese tiempo, se realizaron cinco lavados de 5 minutos cada uno con buffer 1 y se preparó 20 ml del mismo buffer con el anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina<sup>TM</sup> Kirkegaard and Perry, Maryland, USA. en una dilución 1:10000 y se incubó por una hora. Cumplido el

tiempo se realizaron 5 lavados como está descrito anteriormente. Finalmente, se preparó 20 ml de Buffer 3 [100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>] que contenía 90 µl de Nitroblue Tetrazolium (NBT) y 70µl de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyl disodio fosfato (BCIP), se colocó sobre la membrana y con agitación ligera se esperó la aparición de bandas marcadas, consecutivamente se detuvo la reacción reveladora con agua destilada.

**3. 13. Producción de anticuerpos policlonales en conejos:** Se inoculó 1 ml de cultivo de *Leptospira* cepa original (10<sup>7</sup> cél/ml) a un conejo por tres ocasiones cada 15 días. La inoculación final se realizó con una mezcla 1:1 cultivo de *Leptospira* e hidróxido de magnesio y aluminio que se utilizó como adyuvante. Finalmente, se extrajo el suero del animal inoculado (3).

**3. 14. Ensayo de virulencia en Hámsters:** Para demostrar la virulencia de las cepas original y mutante de *Leptospira interrogans* serovar Lai, se procedió a infectar hámsters de 4 semanas con 1 ml de cultivo de *Leptospira* (10<sup>7</sup> cél/ml), se escogieron dos hámsters para cada cepa y dos no infectados como controles, luego de 4 semanas fueron sacrificados los animales infectados y controles. Se extrajeron los riñones, fueron macerados y colocados en forma aséptica en tubos con medio EMJH líquido, se incubó a 30 °C por dos horas para facilitar la salida de la bacteria al medio. Luego, se sembró una y dos gotas del cultivo anterior en dos tubos con EMJH semisólido, se incubó a 30°C por 14 días (3).

**3. 15. Secuenciamiento del locus *rfb* de *Leptospira interrogans* serovar Lai:**

El ADN extraído de las cepas de *Leptospira interrogans* serovar Lai cepa silvestre y mutante, fue enviado al Departamento de Microbiología de la Universidad de Monash en Australia, para realizar el secuenciamiento de los genes que conforman el locus *rfb* de ambas cepas.

## 4. RESULTADOS

### 4. 1. Obtención de la cepa mutante de *Leptospira interrogans* serovar Lai

La cepa de *Leptospira interrogans* serovar Lai mutante fue seleccionada luego de varias exposiciones de la cepa original al anticuerpo monoclonal F70C711. La caracterización de la cepa mutante se logró gracias a la prueba de Aglutinación Microscópica (MAT) que reveló un título de 1:320 en la cepa original, y en la cepa mutante la aglutinación fue negativa con un título menor a 1:10. Estos resultados sugieren que la cepa mutante ha dejado de producir antígeno O ó algún epitopo de antígeno O que aglutina con el anticuerpo F70C711.

### 4. 2. Fragmentación de ADN de *Leptospira interrogans* serovar Lai con *EcoR1*

La posibilidad de que se trate de una cepa de *Leptospira* contaminante fue descartada mediante el análisis con enzima de restricción *EcoR1*, que se realizó tres veces y se observó siempre un patrón de bandas idéntico para las dos cepas. Esto confirma que las dos cepas corresponden a *Leptospira interrogans* serovar Lai (ver gráfico 1).

### 4. 3. Test de Aglutinación Microscópica (MAT) con otros anticuerpos

Para demostrar que la cepa mutante todavía produce antígeno O, se realizaron varios ensayos de MAT de las cepas original y mutante de *Leptospira interrogans* serovar Lai frente a otros anticuerpos específicos para otras serovariedades de *Leptospira* y con un anticuerpo policlonal obtenido en conejo, luego de la inmunización repetida con la cepa original.

Los resultados obtenidos del ensayo de aglutinación microscópica indican que tanto la cepa original como la mutante aglutinan en presencia de anticuerpos policlonales contra los serogrupos Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola y Bratislava con títulos comparables

entre las dos cepas (ver tabla 2). No se observó aglutinación de las dos cepas en presencia del anticuerpo para el serogrupo Grippythosa. Las dos cepas aglutinan en presencia del anticuerpo policlonal producido en conejo, con una ligera diferencia de título, no representativa. El hecho de que las dos cepas aglutinen en presencia de anticuerpos indica que la cepa mutante continúa produciendo antígeno O pero con ciertas modificaciones que le diferencian del que produce la cepa original.

**Tabla 2**

**Resultados del Test de Aglutinación Microscópica (MAT) de las cepas original y mutante de *Leptospira interrogans* serovar Lai. Los títulos representan la última dilución donde existió aglutinación de *Leptospira*. El título < 1:10 indican que no existió aglutinación en la primera dilución del anticuerpo.**

ANTICUERPO	MAT (títulos)	
	Cepa Original	Cepa Mutante
Monoclonal FC7011 <sup>1</sup>	1:320	< 1:10
Policlonal serogrupo Icterohaemorrhagie <sup>1</sup>	1:5120	1:320
Policlonal serogrupo Pomona <sup>1</sup>	1:2560	1:1280
Policlonal serogrupo Grippythosa <sup>1</sup>	< 1:10	< 1:10
Policlonal serogrupo Canicola <sup>1</sup>	1:640	1:1520
Policlonal serogrupo Bratislava <sup>1</sup>	1:160	< 1:10
Policlonal anti <i>Leptospira interrogans</i> serovar Lai obtenido en conejo <sup>2</sup>	1:160	1:320

<sup>1</sup> Obtenido en el Tropical Royal Institute, Ámsterdam, Holanda

<sup>2</sup> Obtenido en la Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador

#### 4. 4. Análisis de Lipopolisacárido

Los resultados de los análisis electroforéticos de LPS de la cepa silvestre y la cepa mutante no demostraron ninguna diferencia con se puede ver en el gráfico 2, excepto por una pequeña discrepancia en el tamaño de la banda de 22KDa. La existencia de bandas en las dos cepas demuestra que ambas cepas producen antígeno O.



#### **4. 5. Ensayo de Western blot**

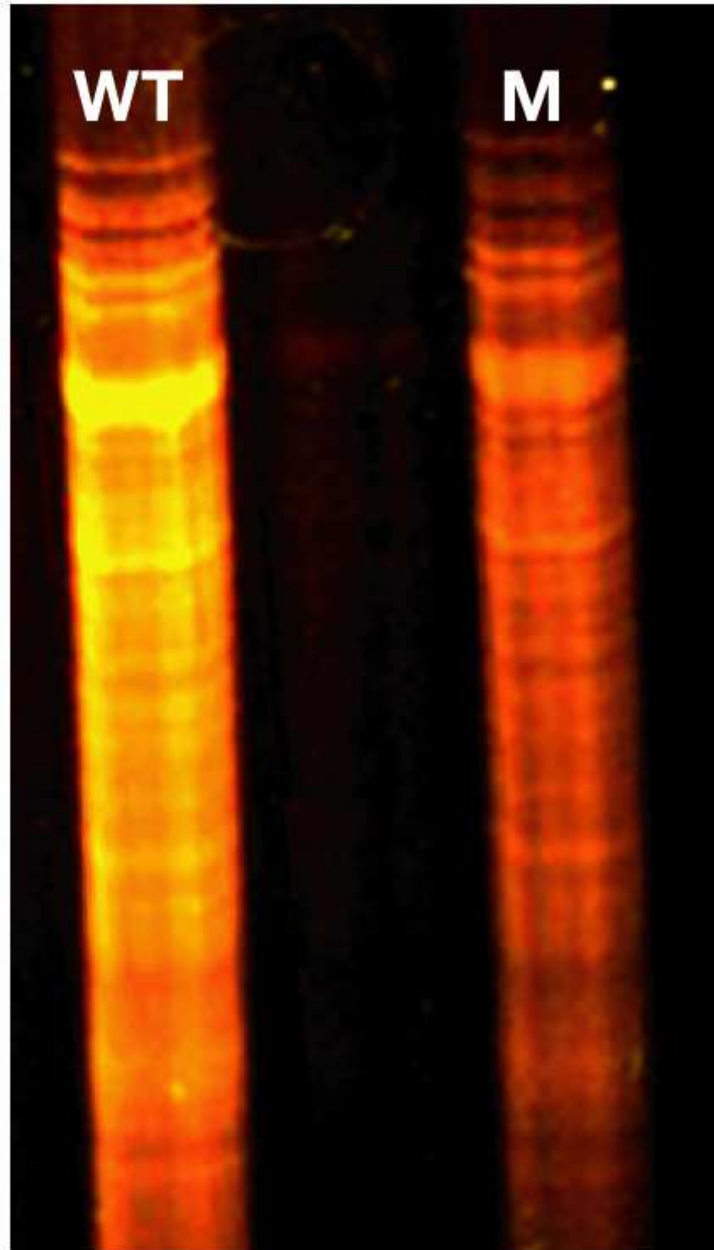
En el análisis de western blot se observa que LPS de la cepa mutante de *Leptospira interrogans* serovar Lai no reaccionó con el anticuerpo monoclonal FC7011, a diferencia de la cepa original donde se tiñeron una serie de bandas que se extiende entre 22 y 60 KDa. Este resultado sugiere la ausencia del epítopo reconocido por el anticuerpo monoclonal F70C711 en la cepa mutante (gráfico 3).

#### **4. 6. Ensayo de virulencia en hámsters**

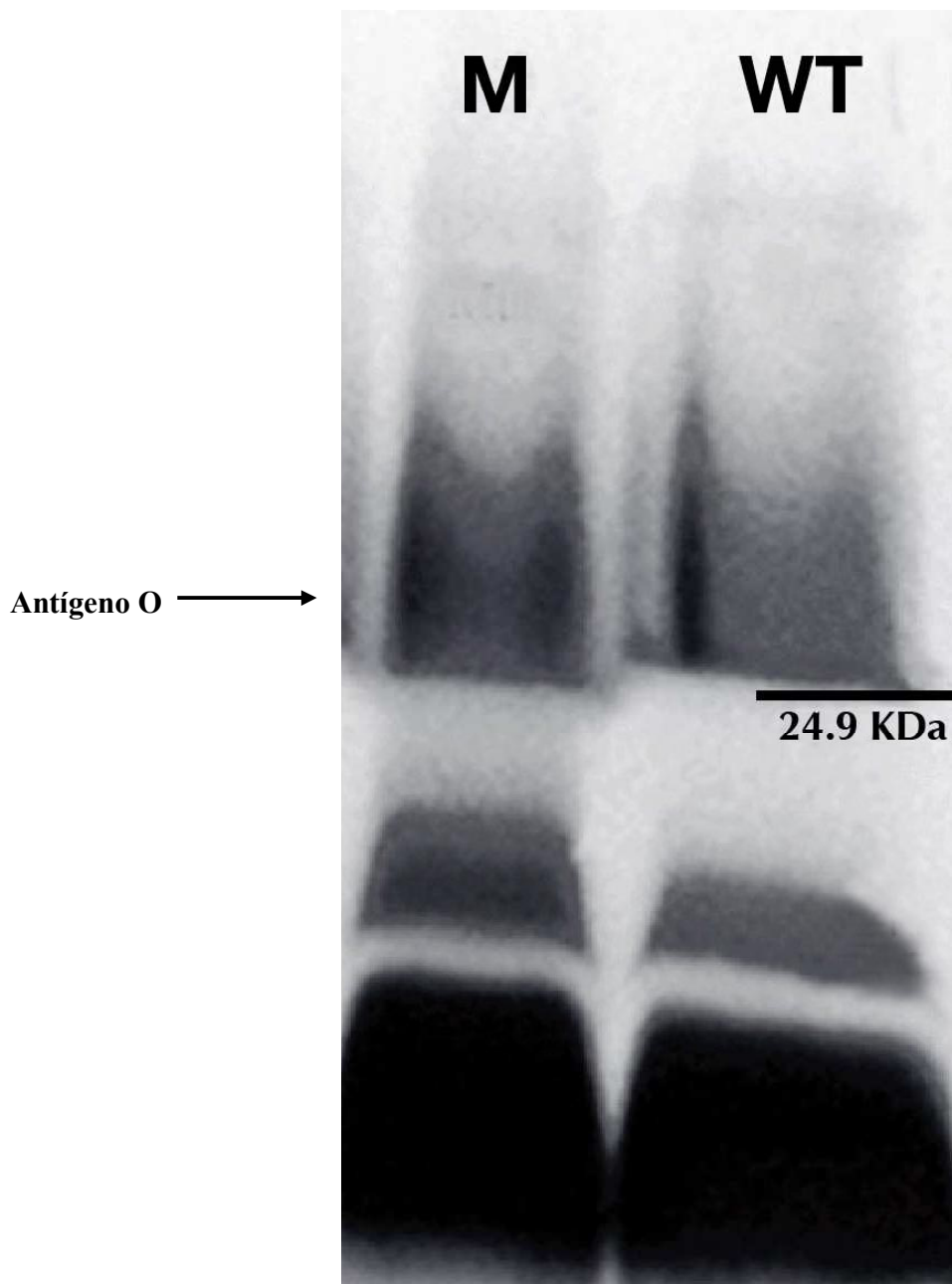
Tanto los animales sanos como los infectados con las cepas original y mutante de *Leptospira interrogans* serovar Lai no mostraron signos ni síntomas de enfermedad. A las cuatro semanas de infección fueron sacrificados y extraídos los riñones para cultivo en medio EMJH, todos los cultivos fueron negativos.

#### **4. 7. Secuenciamiento del locus *rfb***

Como resultado del secuenciamiento de los genes *rfb* que regulan la síntesis de antígeno O, se obtuvo que la cepa mutante de *Leptospira interrogans* serovar Lai presentó un cambio de base en el marco de lectura abierto (orf) 14 que inactiva a este gen.



**Gráfico 1:**  
Gel de agarosa (1%) teñido con bromuro de etidio. Se observa ADN de *Leptospira interrogans* serovar Lai cortado con *EcoRI*. El carril WT corresponde a ADN de la cepa original y M es ADN de la cepa mutante.



**Gráfico 2:**

Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), tinción de LPS con Nitrato de plata. (M) corresponde a LPS de *Leptospira interrogans* serovar Lai cepa mutante, se observa que la banda del antígeno O tiene un peso molecular menor a 22 KDa y (WT) es LPS de la cepa original.



**Gráfico 3:**  
Western blot de LPS de *Leptospira interrogans* serovar Lai. Utilizando el anticuerpo monoclonal FC70C11. El carril (M) corresponde a la cepa mutante y (WT) a la cepa original.

## 5. DISCUSION

El LPS juega un rol muy importante en la inmunidad y en la clasificación serológica de *Leptospira*, sin embargo, se conoce muy poco acerca de su estructura y el mecanismo que dirige el ensamblaje de esta molécula (8, 28). Un factor que limita el estudio de LPS de *Leptospira* es la dificultad para construir mutantes isogénicos por transformación genética (5, 9).

En este estudio se describe la selección y la caracterización parcial de una cepa mutante de antígeno O de *Leptospira interrogans* serovar Lai. Los resultados obtenidos del ensayo de aglutinación microscópica (MAT) demuestran que la cepa mutante no aglutina en presencia del anticuerpo monoclonal FC7011 a diferencia de la cepa original que tiene un título de 1:320. Una característica importante de este mutante es que continúa produciendo antígeno O de características casi indistinguibles con relación a la cepa original. La evidencia de esto se encuentra en los resultados de MAT con anticuerpos policlonales para otros serogrupos de *Leptospira* (ver tabla 2) que demuestran que la cepa mutante todavía produce antígeno O que le permite aglutinar en presencia de anticuerpos contra antígeno O al igual que la cepa original, a pesar de que ha perdido algún epitopo, como resultado de la selección ejercida por parte del anticuerpo monoclonal FC70C11. De igual manera, en el análisis electroforético de LPS de las cepas silvestre y mutante se visualiza un patrón de bandas muy comparable, excepto por una pequeña diferencia en el tamaño de la banda que corresponde a 24.9 KDa como muestra el gráfico 2. La existencia de bandas en las dos cepas demuestra que ambas cepas producen antígeno O y la ligera pérdida de masa molecular por parte de la cepa mutante indica que ha dejado de producir algún epitopo de su antígeno O.

Para el análisis de western blot se utilizó el anticuerpo monoclonal FC70C11 que reacciona con una fracción de antígeno O de LPS de *Leptospira* (ver gráfico 3) en el cual se observa que la cepa original presenta una banda que inicia a una altura de 24.9 KDa y se extiende hasta 60 KDa. La interpretación de esta reacción es que el antígeno O contiene cadenas de polisacáridos de longitud variable y el epitopo (que posiblemente es de tamaño pequeño a

juzgar por la diferencia de peso molecular) estaría asociado a estas cadenas, en la cepa mutante no se visualiza ninguna banda lo cual confirma que carece del epitopo que reconoce el anticuerpo monoclonal FC70C11.

El análisis del locus *rfb* de la cepa mutante de *Leptospira interrogans* serovar Lai demostró que existe una mutación puntual en el segmento que corresponde al marco de lectura abierto 14 (*orf 14*) introduciendo una terminación temprana que trunca este segmento. En otras bacterias Gram negativas mutantes de este gen se ha encontrado que el LPS está conformado por lípido A - región central (core) y una sola subunidad de antígeno O (29), probablemente esto explica que la cepa mutante tenga un antígeno O de menor peso molecular que la cepa original. Los datos del secuenciamiento del locus *rfb* de *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjobovis, muestran que la secuencia que corresponde al *orf 14* no presenta similitud con las secuencias de otras bacterias Gram negativas y talvez esto puede deberse a que la membrana de *Leptospira* tiene un alto contenido de lípidos. A pesar, de su bajo nivel de homología se le ha asignado la función putativa de una polimerasa del antígeno O (*wzy*) (11). Posiblemente, se trata de un gen, que contribuye a una alta divergencia y especificidad del antígeno O entre las serovariedades de *Leptospira*. La comparación de secuencias del *orf14* entre las cepas de *L. interrogans* serovar Pomona y *L. borgpetersenii* serovar Harjobovis también muestra un bajo porcentaje de identidad y similitud, no obstante, los perfiles de hidrofobicidad son muy comparables (5). La presencia de este gen *wzy* conduce a pensar que *Leptospira* podría utilizar un mecanismo dependiente de este gen para ensamblar su antígeno O (11).

Por otro lado, un trabajo reciente indica que *Leptospira* es capaz de reducir la expresión de ciertos epitopos inmunodominantes *in vivo* (26). Es posible que la complejidad del locus de LPS de *Leptospira* (comparado con el de otras bacterias Gram negativas) le permita perder algunos epitopos mediante mutaciones, sin eliminar la estructura principal del antígeno O. Esta propiedad podría conferir una oportunidad para escapar de una muerte segura cuando la concentración de anticuerpos es muy elevada en el organismo durante la fase crónica de la leptospirosis.

Estudios realizados en otras bacterias, establecen que regulaciones en la expresión de antígeno O podría tener incidencia directa en la expresión de factores de virulencia (36). Se conoce que las diferencias en la estructura del LPS, específicamente en el antígeno O tienen incidencia directa en la habilidad para infectar, causar enfermedad y especificidad por el hospedador, por parte de ciertas bacterias Gram negativas. Por ejemplo *Pseudomona aeruginosa* cuando es cultivada *in vitro* contiene largas cadenas de repeticiones de azúcares que conforman su antígeno O, mientras tanto que los aislados de pacientes con fibrosis quística presentan una pequeña cadena de antígeno O ó carecen del mismo. En *Yersinia entetocolitica* la expresión de antígeno O es reprimida a una temperatura de 37°C. En el caso de *Bordetella bronchiseptica* y *Bordetella pertusis* la estructura del LPS varía en respuesta a las condiciones del medio externo y esto a su vez está asociado con la regulación de factores de virulencia (27). Sin embargo, estos cambios en la conformación de LPS pueden ser reversibles y en respuesta a algún cambio o estímulo del medio externo. En el caso de la cepa mutante de *Leptospira*, que no expresa un epitopo del antígeno O, se ha observado que este cambio es estable y se ha mantenido por un largo tiempo, lo cual se ha comprobado por ensayos de MAT periódicos. Si se considera que *Leptospira* vive en dos ambientes diferentes y tiene especificidad por el hospedador, se podría pensar que el LPS juega un papel muy importante en la adaptación de esta bacteria a estos ambientes y talvez se trata de un mecanismo que le habilita a la bacteria para vivir en estos ambientes. En este estudio, encontramos que ambas cepas (mutante y salvaje) han perdido la capacidad de infectar, por lo tanto no se pudo investigar patogenicidad.

Como resultado final de esta investigación, se ha logrado seleccionar una cepa mutante de *Leptospira interrogans* serovar Lai sin transformación genética, que tiene un cambio en la estructura de su LPS, caracterizado por la pérdida de un epitopo del antígeno O, el cual ha sido eliminado debido a mutaciones puntuales en un gen que realiza la unión de las subunidades de cadenas de azúcares que conforman el antígeno O y no afecta su síntesis y la estructura de la molécula de LPS. Este hallazgo, lleva a pensar que *Leptospira* tiene un LPS polivalente que expresa varios epitopos y pueden cambiar en presencia de anticuerpos. Zuerner y Trueba (30), describen que la regulación de los genes que intervienen en síntesis de antígeno O podrían darse fuera del operón *rfb* por inserción de transposones codificados

por secuencias IS presentes en el genoma de *Leptospira*. Estos dos procesos podrían ocurrir *in vivo* como mecanismos que le permiten a *Leptospira* evadir la respuesta inmunitaria. Esto confirma que el ensamblaje de LPS es un proceso bastante complicado y los cambios en su estructura podrían estar regulados por mecanismos ubicados dentro y fuera del grupo de genes que dirigen la biosíntesis de LPS, lo cual complica la utilización de LPS como antígeno principal para el desarrollo de vacunas contra *Leptospira*.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Levett, P.N. (2001) Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 14: 296-326.
- [2] Faine, S., Adler, B., Bolin, C.A. and Petrolat, P. *Leptospira and Leptospirosis*, Second Edition, MediSci, Melbourne, Australia, 1999.



- [3] Hartskeerl, R. et al. International Course on Laboratory Methods for the Diagnosis of Leptospirosis, Royal Tropical Institute, Department of Biomedical Research, WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis. 1999.
- [4] Trueba, G., Zapata, S., Madrid, K., Cullen, P.A. and Haake, D.A. (2004) Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int. Microbiol.* 7: 35-40.
- [5] Bulach, D.M, de la Peña-Moctezuma, A., Kalambaheti, T., and Adler, B. (2000) Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2: 375-380.
- [6] De la Peña-Moctezuma, A., Bulach, D.M., Kalambaheti, T., and Adler, B. (2001) Genetic differences among the LPS biosynthetic loci of serovars of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 31: 73-81.
- [7] De la Peña-Moctezuma, A., Bulach, D.M., Kalambaheti, T., and Adler, B. (1999) Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* Subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* Subtype Hardjobovis. *FEMS Microbiol. Lett.* 177: 319-326.
- [8] Bulach DM, Kalambaheti T, de la Peña-Moctezuma, Adler B (2000) Functional analysis of genes in the *rfb* locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo, subtype Hardjobovis. *Infect. Immun.* 68: 3793-3798.
- [9] Mitchison M, Bulach D, Vinh T, Rajakumar K, Faine S, Adler B (1997) Identification and characterization of the dTDP-rhamnose biosynthesis and transfer genes of the lipopolysaccharide-related *rfb* locus in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *J. Bacteriol.*, 179: 1262-1267.
- [10] Raetz, C. R. H. (1996) Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles, in *Escherichia coli* and *Salmonella*, Vol. I (Neidhardt, F., ed.), Second Edition, pp. 1035-1063, ASM Publications, Washington, DC.
- [11] Kalambaheti T., Bulach DM, Rajakumar K, Adler B (1999) Genetic organization of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthetic locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjobovis. *Microb Pathog.* 27: 105-117.
- [12] Jost B.H., Adler, B., Faine, S. (1989) Experimental immunization of hamsters with lipopolysaccharide antigens of *Leptospira*. *J. Med. Microbiol.* 29: 115-120.
- [13] Trueba, G.A. (1989) Evaluating of an enzyme immunoassay for use in diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle. Thesis.
- [14] Vinetz, J.M. (2001) Leptospirosis, *Curr. Opinion in Infection Diseases*, 14:527-538.

- [15] Boon, Hinckley, M., Reynolds, C.M., Ribeiro, A.A., McGrath, S.C., Cotter, R.J., Lauw, F.N., Golenbock, D.T., Raetz, C.R., (2005) A *Leptospira interrogans* enzyme with similarity to yeast Ste14p that methylates the 1-phosphate group of lipid A. *J. Biol. Chem.*, 280: 30214-30224.
- [16] Werts, C., Tapping, R. I., Mathison, J. C. & 13 other authors (2001) Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol.* 2: 346–352.
- [17] Que-Gewirth NLS, Ribeiro AA, Kalb SR, Cotter RJ, Bulach DM, Adler B, Saint Girons I, Werts C, Raetz CRH (2004) A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* lipid A: The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. *J. Biol. Chem.*, 279: 25420-25429.
- [18] 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. (2004) Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37: 459-77.
- [19] Babudieri, B. (1971) Isolation and study of antigenic mutants of saprophytic and pathogenic leptospires. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I Abt. Orig.* 218: 75-86.
- [20] Hitchcock JP, Brown TM (1983) Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* 154: 269–277.
- [21] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- [22] Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350–4354.
- [23] Cullen, P.A., Xu, X., Matsunaga, J., Sánchez, Y., Ko, A.I., Haake, D.A. (2005) Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect. Immun.*, 73: 4853-4863.
- [24] Cullen, P.A., Haake, D.A., Adler, B. (2004) Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 291-318.
- [25] Cullen, P., Cordwell, S., Bulach, D., Haake, D., Adler, B. (2002) Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect. Immun.*, 70: 2311-2318.
- [26] Nally, J. E., Chow, E., Fishbein, M. C., Blanco, D. R., Lovett, M. A. (2005). Changes in Lipopolysaccharide O Antigen Distinguish Acute versus Chronic *Leptospira interrogans* Infections. *Infect. Immun.* 73: 3251-3260.

- [27] Mattoo, S. and Cherry J. D., Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies Clin. Microbiol. Rev., 18: 326-382.
- [28] Raetz CR, Whitfield C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. Annu. Rev. Biochem. 71: 635-700.
- [29] Bourhy, P., Louvel, H., Saint Girons, I., Picardeau, M., (2005) Random insertional mutagenesis of *Leptospira interrogans*, the agent of leptospirosis, using a mariner transposon, J. Bacteriol. 187: 3255-3258.
- [30] Zuerner, R.L. and Trueba, G.A., (2005) Characterization of IS1501 mutants of *Leptospira interrogans* serovar Pomona, FEMS Microbiol. Lett. 248: 199-205.
- [31] 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., Degraeve, W.M., Dellagostin, O.A., El-Dorry, H., Ferro, E.S., Ferro, M.I., Furlan, L.R., Gamberini, M., Giglioti, E.A., Goes-Neto, A., Goldman, G.H., Goldman, M.H., Harakava, R., Jeronimo, 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., (2004) Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis, J. Bacteriol. 186: 2164-2172.
- [32] Murray, G. L., Attridge, S. R., and Morona, R., (2003) Regulation of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. Mol. Microbiol. 47:1395–1406.
- [33] Yépez, W., Espinosa, A. y Escobar, G. (2001) Revista científica C.M.G, Volumen 2. Guayaquil, Ecuador.
- [34] Bon, C., Danelon, F., Winterhalter, M., and Zaccai, G. Characterization of transport properties of bacterial porins: a study of internal dynamics-function relationship. Biophysique membranaire, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, France.
- [35] Skurnik, M. and Bengoechea, J. (2003) The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersinia*. Carbohydr. Res. 223: 2521-2529.
- [36] Alitalo, A. Meri, T. Rämö, L. Jokiranta, T.S. Heikkilä, T. Seppälä, I.J.T. Oksi, J. Viljanen, M. Meri, S. (2001) Complement Evasion by *Borrelia burgdorferi* Serum-Resistant Strains Promote C3b Inactivation. Infect. Immun. 69:3685-3691.
- [37] Rautemaa, R., and S. Meri. (1999). Complement-resistance mechanisms of

bacteria. *Microbes Infect.* 1:785–794.

