



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis presentado para optar al Grado de Doctor de la
Facultad de Ciencias Exactas

Estudio de mecanismos de la inmunidad innata en la patogénesis de la Leptospirosis

LIC. MAIA TATIANA CEDOLA

Director: Dr. Ricardo M. Gómez

Año 2014

ESTUDIO DE MECANISMOS DE LA INMUNIDAD INNATA EN LA PATOGÉNESIS DE LA LEPTOSPIROSIS

LIC. MAIA TATIANA CEDOLA

Director: Dr. Ricardo M. Gómez

Tesis doctoral 2014

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas



Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM)

*La vida es aquello que te va sucediendo
mientras te empeñas en hacer otros planes.*

- John Lennon

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por brindarme la formación gratuita necesaria y la posibilidad de acceder al título de “Doctor”.

A CONICET, por becar mi trabajo y permitirme llegar a la meta.

Al IBBM, por abrirme sus puertas durante estos años para que pudiera desarrollar mi trabajo de tesis. A todos sus integrantes -investigadores, becarios y CPAs- muchas gracias.

Al Dr. Víctor Romanowski, por brindarme un espacio de trabajo.

A Ricardo, por haber creído en mí y por haberme dado la oportunidad de progresar en mis estudios bajo su dirección. ¡Muchísimas gracias!.

A los colaboradores de este trabajo: la Dra. Bibiana Brihuega, quien gentilmente nos brindó diferentes cepas de *Leptospira*; el Dr. Ricardo Drut, quien evaluó la histopatología; Leonardo Rivadeneyra y la Dra. Mirta Schattner, quienes ayudaron con los estudios de agregación plaquetaria; la Dra. ALTO Nascimento, quien nos brindó el antisuero anti-LipL32; y la Dra. Bibiana Vanasco y Yosena Chiani, quienes nos proporcionaron las muestras de pacientes con Leptospirosis. Gracias a todos.

A mi familia, por apoyar mis decisiones educativas y porque siempre me ayudaron en cuanto pudieron. Gracias, ¡los quiero!.

A Elizabeth, porque sin sus consejos nunca hubiera llegado tan lejos. Por escucharme y confiar en mí (es mutuo). ¡La quiero mucho!.

A Noelia, por hacerme reír de risa como nadie, por ser mi compañera de estudios y más tarde también de trabajo, por compartir mis logros y frustraciones, por ser mi cómplice, por su honestidad bruta, ¡por 10 años de amistad! ¡Te quiero mucho! Guille1, ¿no?.

A Ailín, por recorrer este camino conmigo, primero durante la carrera y después más a la distancia, pero siempre presente. ¡Dale Ñoñez que falta poco! ¡Te quiero amiga!.

A Mati, por estar SIEMPRE. Por su transparencia, por nuestras charlas, por ser un gran amigo y ayudarme en todo. ¡Espero que sigas tu camino como soñás! Te súper quiero.

A Leo, por hacerme reír con su carcajada contagiosa que extraño escuchar (¡grabame un ringtone!), por ser mi compañero de series y por bancarme en todas mis obsesiones (sólo con vos). Por ser mi amigo. ¿Sabés cuánto te quiero?. Sé que vas a llegar lejos, no te desanimes. “¡¡ARRANCÁ!!”.

Al trío de fierro: Gabi, Emi y Lucre. ¡MIL GRACIAS por la ayuda enorme que me dieron con este trabajo!. Sin ustedes hubiera quedado a medio camino. A Gabi, por ser mi compañera cinéfila, por reírse de ella misma y dejarnos reírnos con ella, por su frase histórica “agarrá la pala”. A Emi, porque resultó ser una mina de diez, siempre dispuesta a todo. ¡Gracias por el ratoncito y los dumbitos y tu frase célebre (sabés cuál)! A Lucre, por su actitud frente al trabajo y a la vida en general, por su positividad constante. ¡LAS ADORO CHICAS!.

A Santi, por su elocuencia permanente y porque nunca jamás se negó a ayudar a quien se lo pidiera. ¡Siempre al pie del cañón!.

A Flor, Leti y Caro, porque siempre me dieron una mano cuando las necesité, y porque siempre se preocupan para que nuestro lugar de trabajo prospere. ¡Gracias chicas!.

A Jesi, a Florcita y a Caty porque siempre tuvieron la mejor onda conmigo.

A los VA que conocí un poquito -Ale, Fer, Ricky y Javi-, gracias por hacerme un lugarcito entre ustedes.

Por último, quiero dedicarle esto a mi abuela María, a quien extraño cada día un poco más. Sé que estarías orgullosa de mí, ojalá pudiera abrazarte en este momento.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	10
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	15
1.1. Aspectos históricos.....	15
1.2. <i>Leptospira</i> y Leptospirosis.....	16
1.2.1. Taxonomía.....	18
1.2.2. Epidemiología	19
1.2.3. Reservorio y transmisión de la infección	20
1.2.4. Curso clínico	21
1.2.5. Respuesta inmune	24
1.2.6. Patogénesis: invasión de tejidos y evasión de la respuesta inmune.....	26
1.3. Modelos animales	31
1.4. Diagnóstico.....	32
1.5. Tratamiento.....	33
1.6. Medidas de control y prevención	33
1.7. Impacto socio-económico	35
1.8. Prevalencia e incidencia en la República Argentina.....	35
OBJETIVOS GENERALES.....	37
CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS BatA Y BatB	39
2.1. Introducción	39
2.2. Objetivos específicos.....	44
2.3. Resultados.....	45
2.3.1. Cultivo de diferentes cepas de <i>Leptospira</i>	45
2.3.2. Análisis bioinformático	45
2.3.3. Distribución de los genes <i>lic20040</i> y <i>lic20041</i> y análisis transcripcional entre cepas de <i>Leptospira</i>	47
2.3.4. Clonado, expresión y purificación.....	49
2.3.5. Producción de antisuero anti-LIC20040.....	52

2.3.6.	Expresión <i>in vivo</i> del gen <i>lic20040</i>	52
2.3.7.	Análisis de antigenicidad de LIC20040	53
2.3.8.	Localización celular de LIC20040	54
2.3.9.	Ensayo de agregación plaquetaria	55
2.4.	Discusión	56
CAPÍTULO III: ROL DE LOS NEUTRÓFILOS EN LA LEPTOSPIROSIS		60
3.1.	Introducción	60
3.2.	Objetivos específicos	62
3.3.	Diseño experimental	62
3.4.	Resultados	63
3.4.1.	Eficiencia de la depleción de neutrófilos	63
3.4.2.	Curso clínico	64
3.4.3.	Cuantificación de la carga bacteriana	65
3.4.4.	Análisis histopatológico renal	66
3.4.5.	Efecto de la neutropenia sobre la respuesta humoral	67
3.4.6.	Niveles transcripcionales de citoquinas en cultivos de esplenocitos estimulados con LIC	68
3.5.	Discusión	69
CAPÍTULO IV: RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO DEL TLR2 Y LA LEPTOSPIROSIS		73
4.1.	Introducción	73
4.2.	Objetivos específicos	76
4.3.	Diseño experimental	76
4.4.	Resultados	76
4.4.1.	Amplificación del gen <i>tlr2</i>	76
4.4.2.	Digestión de fragmentos de DNA	78
4.4.3.	Genotipificación y frecuencias alélicas	78
4.5.	Discusión	80
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES GENERALES		84

CAPÍTULO VI: MATERIALES Y MÉTODOS.....	87
6.1. Productos químicos y enzimas	87
6.2. Medios.....	87
6.2.1. LB (Luria-Bertani)	87
6.2.2. Medio enriquecido EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris).....	87
6.3. Cepas bacterianas	88
6.3.1. Cepas de <i>Leptospira spp.</i>	88
6.3.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	88
6.4. Animales.....	88
6.5. Selección <i>in silico</i> de LIC20040 y LIC20041: Análisis bioinformático	89
6.6. Aislamiento de DNA genómico	90
6.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	91
6.6.2. Electroforesis en geles de agarosa.....	91
6.6.3. Purificación de fragmentos de DNA.....	92
6.7. Clonado de las proteínas recombinantes.....	92
6.7.1. Digestión de DNA con enzimas de restricción	93
6.7.2. Reacción de ligación.....	94
6.7.3. Transformaciones de bacterias competentes	94
6.7.4. Identificación de transformantes por Colony PCR.....	95
6.7.5. Método de lisis alcalina para la extracción de plásmidos	96
6.8. Preparación de células electro-competentes	96
6.9. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes	97
6.9.1. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).....	98
6.10. Producción de antisuero policlonal	99
6.11. Western Blot.....	99
6.12. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).....	100
6.12.1. Evaluación del suero policlonal.....	100
6.12.2. Detección de anticuerpos contra la proteína recombinante en sueros humanos	100
6.12.3. Detección de la localización celular de BatA	101
6.12.4. Detección de anticuerpos anti-LIC IgM e IgG totales y determinación de las subclases de IgG	101

6.13.	Ensayo de agregación de plaquetas	101
6.13.1.	Obtención y purificación de plaquetas humanas	101
6.13.2.	Agregación plaquetaria	102
6.14.	Depleción de neutrófilos	103
6.14.1.	Recuento de neutrófilos	103
6.15.	Aislamiento de esplenocitos e inducción de la expresión de citoquinas	103
6.16.	Extracción de RNA y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)	104
6.17.	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	104
6.18.	Histología e inmunohistoquímica	106
6.19.	Digestión de fragmentos del gen <i>tlr2</i>	107
6.20.	Análisis estadístico	107
BIBLIOGRAFÍA		109

ABREVIATURAS

μg	Microgramos (10^{-6} gramos)
μl	Microlitros (10^{-6} litros)
μm	Micrometros (10^{-6} metros)
μM	Micromolar (10^{-6} molar)
Bat	<i>Bacteroides aerotolerance genes</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
CAM	Molécula de adhesión celular
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CO₂	Dióxido de carbono
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Dexocirribonucleótidos
DO	Densidad óptica
d.p.i.	Días post-infección
ECL	Electroquimioluminiscencia
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EMJH	Medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
g	Fuerza gravitacional
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HisTag	Secuencia de 6 histidinas consecutivas

H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HRP	Peroxidasa de rábano
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IMAC	Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados
IFNγ	Interferón gamma
i.p.	Intraperitoneal
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
KCl	Cloruro de potasio
kDa	10 ³ Daltons
KHCO₃	Bicarbonato de potasio
LB	Medio Luria-Bertani
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LIC	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
MAT	Test de aglutinación microscópica
mg	Miligramos (10 ⁻³ gramos)
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MIDAS	Sitio de adhesión dependiente de ion metálico
ml	Mililitros (10 ⁻³ litros)
mM	Milimolar (10 ⁻³ molar)
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio

NaPO₄H₂	Fosfato monosódico
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
ng	Nanogramos (10 ⁻⁹ gramos)
NH₄Cl	Cloruro de amonio
Ni²⁺-NTA	Ácido nitrilotriacético conjugado con níquel
nm	Nanómetro (10 ⁻⁹ metro)
OMP	Proteína de membrana externa
ON	<i>overnight</i> (durante la noche)
OPD	Orto-fenil-dietanolamina
ORF	Marco de lectura abierto
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PBS-T	PBS + 0,1% Tween-20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PL	Plaquetas lavadas
PPP	Plasma pobre en plaquetas
PRP	Plasma rico en plaquetas
p/v	Peso en volumen
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
qPCR	PCR en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal

SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
SNPs	Polimorfismos de un único nucleótido
TIR	Dominio Toll/IL-1R
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades de enzima
UFC	Unidades formadoras de colonias
v/v	Volumen en volumen
vWA	Dominio von Willebrand Tipo A
vWF	Factor de von Willebrand
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Aspectos históricos

La Leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial que es causada por la infección con especies patógenas del género *Leptospira*, una bacteria que pertenece al filum *Spirochaetes*, que incluye los géneros *Borrelia* y *Treponema*. La enfermedad en humanos tiene un espectro clínico extremadamente amplio, que abarca desde una infección subclínica hasta un síndrome severo de infección multi-orgánica con altas tasas de mortalidad [10]. La Leptospirosis icterica con falla renal, conocida como “Síndrome de Weil”, fue reportada por primera vez en 1886 por Adolf Weil [11], aunque un síndrome idéntico presente en trabajadores cloacales fue descrito tres años antes por Landouzy [12].

En 1915, la etiología de la Leptospirosis se demostró independientemente en Alemania y en Japón, aunque en un principio existía controversia por la nomenclatura empleada, por lo que probablemente haya sido demostrada diez años antes. En 1917 se descubrió que la rata es una fuente de infección para los seres humanos [13] y tempranamente se reconoció el factor ocupacional como un factor de riesgo. Se sugirió que la especie *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae se introdujo en Europa Occidental en el siglo XVIII por la extensión del hábitat de *Rattus norvegicus* (la rata) desde Eurasia [10]. Por otra parte, la Leptospirosis en perros fue reconocida, pero la distinción clara entre la infección canina por *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae y *Canicola* llevó varios años.

La investigación básica se ha centrado en el estudio del metabolismo y crecimiento de la bacteria, los métodos de diagnóstico serológicos, el tratamiento de la enfermedad y el control epidemiológico. En años más recientes, el desarrollo de la ingeniería genética y la biología molecular han ampliado el campo de estudio, el cual ahora está enfocado en conocer el mecanismo de invasión e infección del huésped y en la búsqueda de vacunas efectivas de uso veterinario y humano.

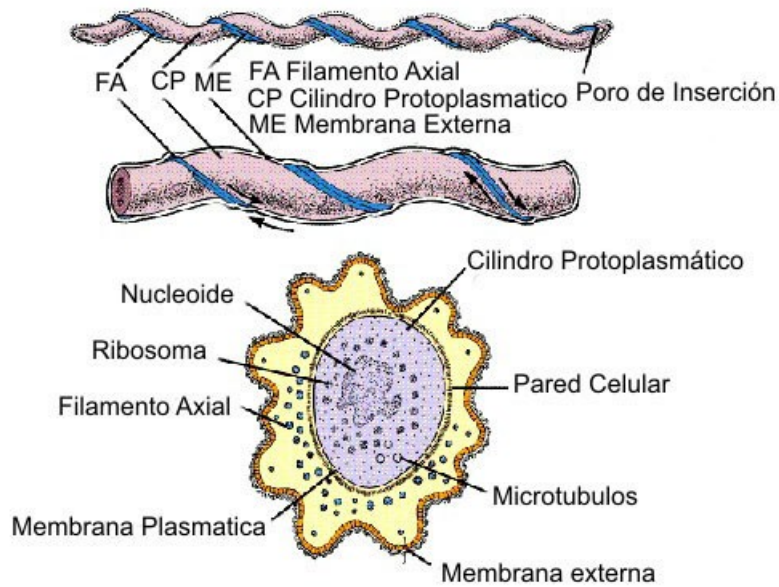


Figura 1.1. Representación esquemática de la morfología de *Leptospira* spp. El cilindro protoplasmático que contiene el genoma está envuelto por una membrana externa. Los filamentos axiales se ubican en el periplasma, desde los extremos hacia el centro de la célula. *Imagen adaptada de Microbiology 6ta. Edición [6].*

1.2. *Leptospira* y Leptospirosis

Las leptospiras son espiroquetas aerobias obligadas, extracelulares, muy móviles, que comparten características tanto con bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, aunque en general se las relaciona más a las primeras [14]. Las leptospiras tienen aproximadamente 0,25 μm de diámetro por 6–25 μm de largo, por lo que pueden atravesar filtros de 0,45 μm . Estos microorganismos se tiñen pobremente con los colorantes habituales, pero se pueden visualizar en preparaciones húmedas con un microscopio de campo oscuro o de contraste de fase.

Mediante microscopía electrónica, se observó que las leptospiras poseen un cuerpo celular cilíndrico (cilindro protoplásmico) envuelto helicoidalmente alrededor de un cilindro interior (citoplasma), que incluye dos filamentos axiales insertados en las extremidades del cuerpo celular, con sus extremos libres dirigidos hacia el centro de la célula [15] (**Figura 1.1**). Además, los cilindros están recubiertos por una envoltura externa, demarcada por una membrana plasmática, que confiere una mayor integridad. Los filamentos axiales, ubicados en el espacio periplásmico y unidos a la superficie interna de la membrana, son estructuras citoesqueléticas que permiten el movimiento de la bacteria, ya que se contraen periódica-

mente causando la rotación del espiral [16]. La apariencia y la movilidad de las leptospiras varían con la naturaleza del medio en el cual crecen. En los medios líquidos, aparecen curvadas o con uno o ambos extremos doblados en forma de signo de interrogación (**Figura 1.2A**). De allí deriva el nombre de la especie *Leptospira interrogans*.

Las leptospiras se cultivan en medios artificiales con 10% de suero de conejo o 1% de albúmina sérica bovina, a pH 6,8–7,4 [17]. El medio también debe contener ácidos grasos de cadena larga, ya que es la fuente de carbono que utiliza la bacteria. La temperatura de crecimiento óptima es de 28–30 °C, aunque las especies saprófitas pueden crecer a temperaturas menores. Es importante verificar que no haya bacterias contaminantes luego de 3–4 días de cultivo y realizar un subcultivo a los 7–21 días, aunque las leptospiras pueden sobrevivir en cultivos líquidos estáticos durante meses y a veces hasta años [18]. El medio más utilizado es el Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), el cual contiene 1% de albúmina sérica bovina y Tween-80 como fuente de ácidos grasos de cadena larga [19-21]. En los cultivos en medios semisólidos se puede apreciar la formación de un anillo de crecimiento, denominado “zona de Dinger”, donde las leptospiras se concentran ya que allí la tensión superficial del oxígeno es la óptima (**Figura 1.2B**).

Leptospira spp. posee dos cromosomas, uno de 4.400×10^3 pares de bases o pb

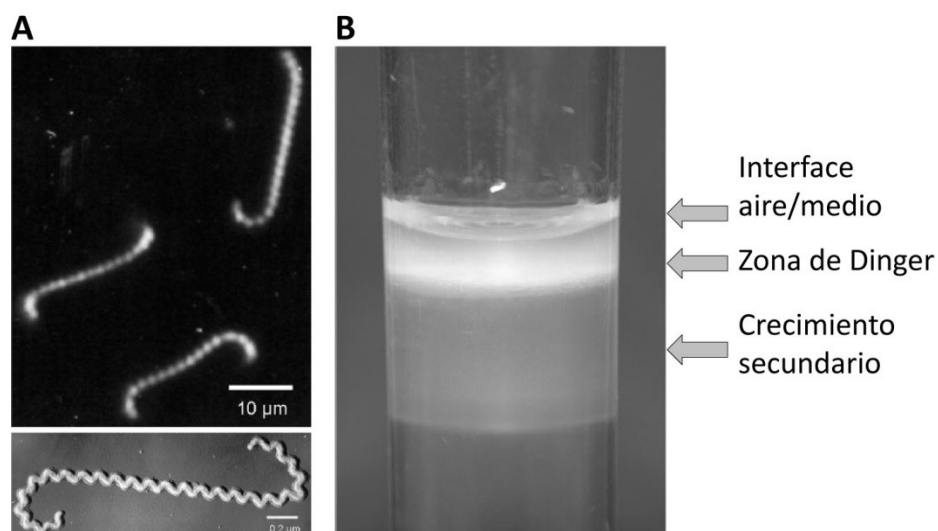


Figura 1.2. **A)** Fotomicrografía de *Leptospira spp.* en microscopio de campo oscuro (arriba) y electrónico (abajo). Se observa el “signo de interrogación” característico en los extremos de la bacteria. **B)** Crecimiento de *Leptospira* en medio semisólido, donde se observa la formación del anillo o zona de Dinger entre la interface aire/medio y la zona de crecimiento secundario. *Imágenes adaptadas de Richard Zuerner (2005) y Ben Adler (2010) [1, 2].*

(cromosoma I) y otro más pequeño de 350×10^3 pb (cromosoma II), con un contenido G+C total de 35-41%. Estos tamaños son aproximados ya que pueden variar levemente entre las diferentes especies, aunque todas las espiroquetas se relacionan filogenéticamente entre sí [22].

1.2.1. Taxonomía

El género *Leptospira* pertenece al filum *Spirochaetes*, clase *Spirochaetes*, orden *Spirochaetales*, familia *Leptospiraceae*. El otro género de esta familia es *Leptonema*. Las espiroquetas más importantes a nivel médico son *Borrelia* y *Treponema* (que pertenecen a la familia *Spirochaetaceae*) y *Leptospira*, por ser las causantes de enfermedades importantes que afectan al hombre (**Tabla 1.1**). En un principio, las leptospiras se dividieron en dos especies serológicas, con la mayoría de los patógenos conocidos o sospechados agrupados en el complejo “interrogans” y todas las leptospiras restantes en el complejo “biflexa”. Ambos complejos fueron divididos en varios serovares utilizando la prueba de adsorción por aglutinación cruzada (CAAT), y los serovares relacionados antígenicamente se agruparon en serogrupos. De esta manera, se han descrito 60 serovares para *L. biflexa* y más de 300 serovares para *L. interrogans*, divididos en 24 serogrupos diferentes. La clasificación por serovares se basa en la expresión de los epítopes expuestos en la superficie en un mosaico de antígenos lipopolisacáridos (LPS), mientras que la especificidad de los epítopes depende de la composición y orientación del azúcar que contiene cada LPS.

Más recientemente, se ha descrito una clasificación molecular que divide al género *Leptospira* en varias especies según la relación de su genoma. Esta reclasificación proporciona información taxonómica útil, pero es independiente de la clasificación serológica ya establecida con la que los epidemiólogos y clínicos están familiarizados. Por lo tanto, las designaciones de “serogrupo” y “serovar” continúan siendo empleadas.

Con la clasificación genotípica, el género se divide en 17 especies que se definen como las leptospiras que están relacionadas genómicamente al menos un 70%, y cuyas secuencias relacionadas de DNA contienen un 5% de bases no pareadas como máximo (divergencia). Es importante notar que ni los serovares ni los serogrupos son indicativos de la rela-

ción taxonómica entre las cepas, ya que un serovar (definido por los anticuerpos dirigidos contra su antígeno lipopolisacárido) puede pertenecer a más de una especie, y miembros de un mismo grupo genético no pertenecen necesariamente al mismo serogrupo.

En el año 2008, el Comité Internacional en Sistemática de Procariotas, agrupó a las especies de *Leptospira* en tres subgrupos. El primer subgrupo está constituido por las genoespecies saprófitas, incluyendo a *Leptospira biflexa*, todos microorganismos de vida libre en superficie y agua y no patogénicos para el hombre. El segundo subgrupo está integrado por 8 genoespecies patogénicas, entre ellas *Leptospira interrogans* y *Leptospira borgpetersenii*. Por último, un tercer subgrupo reúne a todas las genoespecies de “comportamiento intermedio”, cuyo rol en la patogenicidad aún no ha sido demostrado.

Tabla 1.1. Enfermedades causadas por infecciones con espiroquetas

Especie	Enfermedad	Modo de transmisión	Diagnóstico
<i>Treponema pallidum</i>	Sífilis	Sexual y transplacentaria	Microscópico, test serológico
<i>Borrelia Burgdorferi</i>	Enfermedad de Lyme	Mordida de garrapata	Observación clínico y microscópica
<i>Borrelia recurrentis</i>	Fiebre recurrente	Mordida de piojo	Observación clínico y microscópica
<i>Leptospira interrogans</i>	Leptospirosis	Agua y alimentos contaminados por orina de animales infectados (roedores, ganado)	Test serológico y cultivo

1.2.2. Epidemiología

La Leptospirosis es una zoonosis de distribución mundial. La transmisión ocurre tanto en países industrializados como en vías de desarrollo, pero la infección subclínica o sin síntomas es común en regiones endémicas [23, 24]. La incidencia de la infección en humanos es más alta en los trópicos que en las regiones templadas, aunque los índices son subestimados debido a la falta de concientización sobre la enfermedad y la inaccesibilidad relativa e insuficiencia de métodos de diagnóstico rápidos. Nunca ha sido probado que los seres humanos sean fuentes epidemiológicas importantes de transmisión, aunque los individuos pueden excretar leptospiras en la orina durante semanas, meses o años [25].

La prevalencia de diferentes serovares leptospirales dentro de una población humana depende de los animales reservorios presentes y de los serovares que éstos acarrean, como así también de las condiciones ambientales locales, la ocupación y las prácticas agronómicas y de agricultura. Antiguamente, la Leptospirosis era considerada una enfermedad principalmente ocupacional, asociada con actividades como la minería, el mantenimiento de cloacas, la ganadería y carnicería, la medicina veterinaria y las maniobras militares. La importancia relativa de tales riesgos ocupacionales ha disminuido desde la implementación de medidas de protección. Actualmente, la Leptospirosis se ha vuelto prevalente en lugares donde las medidas sanitarias son deficientes resultando en un aumento de la población de roedores reservorios que contaminan el medio ambiente con su orina. Por esta razón, se la considera una enfermedad reemergente asociada a la pobreza, con frecuentes brotes epidémicos durante las inundaciones.

1.2.3. Reservorio y transmisión de la infección

Los animales, incluyendo los seres humanos, pueden dividirse en huéspedes reservorios o accidentales (incidentales). La enfermedad es mantenida en la naturaleza por la infección crónica de los túbulos renales proximales de los huéspedes reservorios, los cuales se definen como las especies donde la infección es endémica y que generalmente se transmite de un animal a otro por contacto directo [10]. Un animal infectado puede permanecer libre de síntomas y excretar leptospiras en su orina durante toda su vida [18]. Otros animales, incluyendo los humanos, pueden infectarse por contacto indirecto con un huésped reservorio, a través del contacto de la piel herida (abrasiones o cortes) o de las mucosas (ojos, boca) con agua y/o suelo contaminados con orina [25] (**Figura 1.3**).

Los mamíferos pequeños son los transmisores más importantes de la Leptospirosis en zonas urbanas, y pueden infectar animales domésticos de granja, perros y humanos. Diferentes especies de roedores pueden ser reservorios de distintos serovares, pero generalmente las ratas son huéspedes reservorios para serovares de los serogrupos Icterohaemorrhagiae y Ballum [26], y los ratones para el serogrupo Ballum. Los animales domésticos también son reservorios de algunos serovares de *Leptospira*, y muchos animales son portadores seronegativos (no presentan anticuerpos específicos).

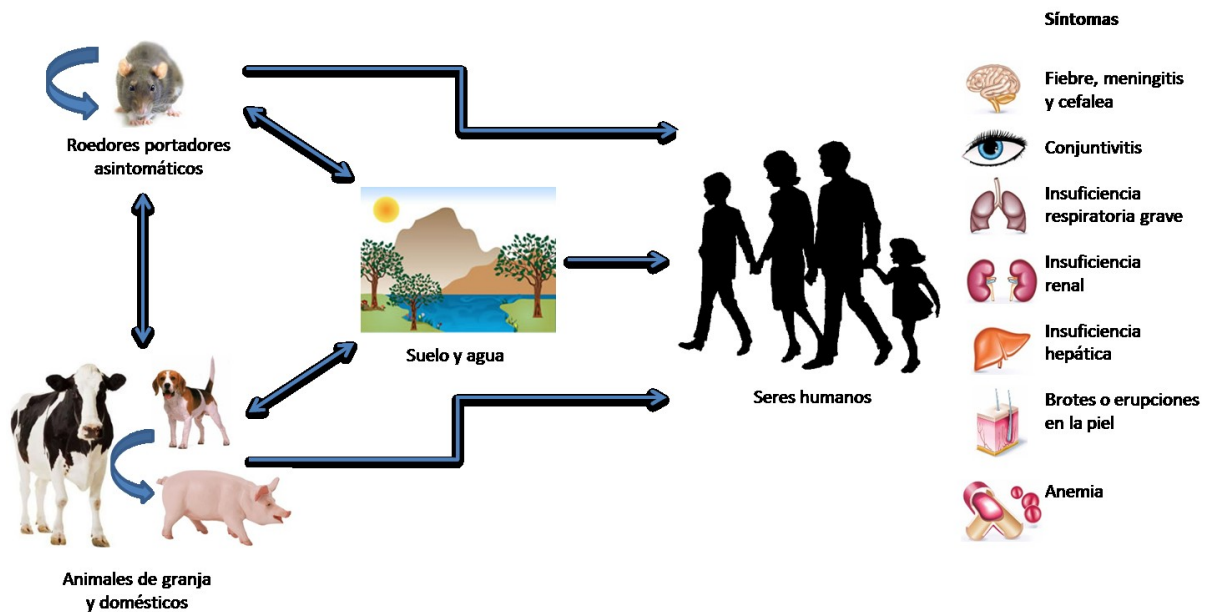


Figura 1.3. Ciclo de infección de *Leptospira interrogans*. Los roedores, en especial la rata, son los reservorios crónicos asintomáticos de la bacteria, y la excretan en su orina. Otros animales y el hombre pueden contagiarse por contacto directo o a través del agua y suelo contaminados con orina. La bacteria ingresa por piel o mucosas, y produce una gran variedad de síntomas.

1.2.4. Curso clínico

En los seres humanos, la Leptospirosis severa es frecuentemente causada por serovares del serogrupo Icterohaemorrhagiae. Los serovares específicos involucrados dependen sobre todo de la localización geográfica y la ecología de los huéspedes reservorios locales. Por ejemplo, los serovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae, portados por las ratas, son generalmente los responsables de las infecciones en Europa; mientras que en el sudeste de Asia es más común el serovar Lai [10]. La mayoría de las infecciones causadas por leptospiras son subclínicas o muy leves, semejantes a una gripe, y con frecuencia las personas no realizan consultas médicas ya que se resuelven solas. Una proporción menor, pero que comprende la mayoría de los casos reconocidos, se presentan como una enfermedad febril de inicio repentino, similar a una gripe de variada intensidad, que puede progresar hacia una falla multi-orgánica, e incluso la muerte [18].

La Leptospirosis tiene un período de incubación de aproximadamente 1-10 días y la presentación clínica de la enfermedad es generalmente bifásica (**Figura 1.4**). La primera fase

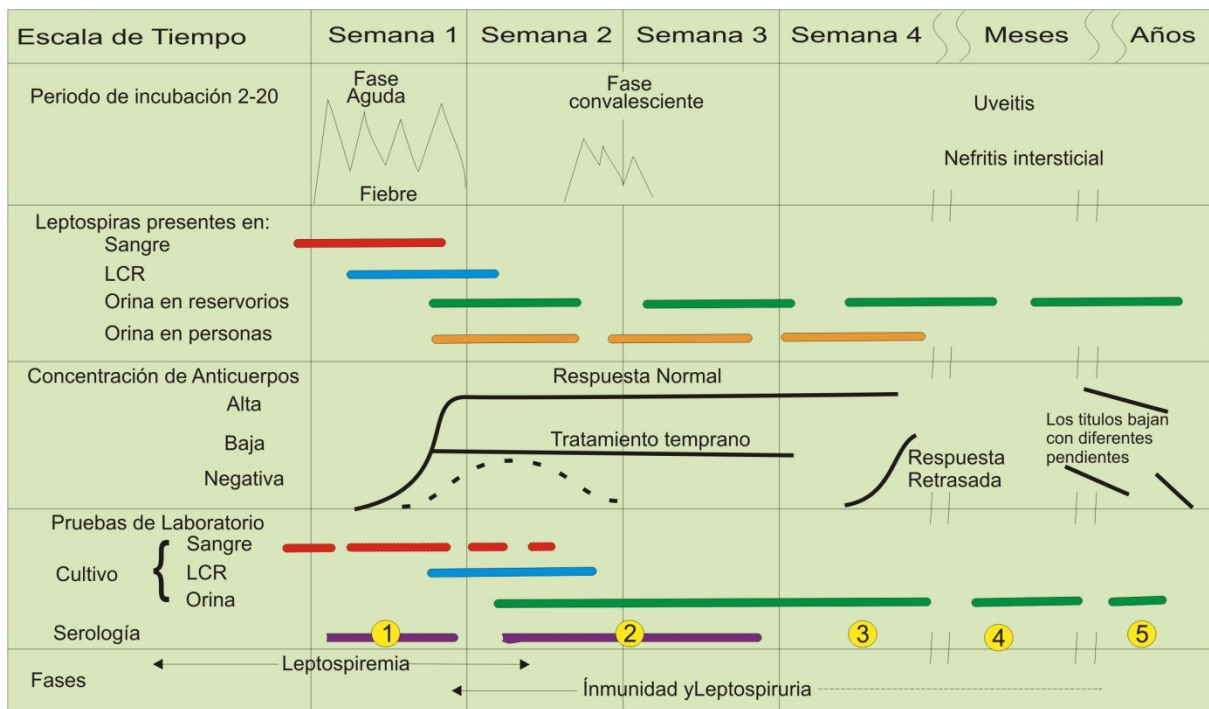


Figura 1.4. Etapas del desarrollo de la Leptospirosis. En general, se trata de una enfermedad bifásica. En la primera fase (etapa 1 en Serología) se pueden aislar leptospiras de sangre y LCR. El inicio de la segunda fase (etapa 2 en Serología) está determinado por la producción de anticuerpos específicos. Las etapas 3, 4 y 5 sirven de seguimiento de la convalecencia. *Imagen adaptada de Turner (1969) [7].*

es aguda y dura aproximadamente una semana. Se denomina **leptospirémica** o septicémica porque las leptospiras pueden aislarse de la sangre y el líquido cefalorraquídeo (LCR). La segunda fase, denominada **leptospirúrica** o inmune, se caracteriza por la producción de anticuerpos específicos, presencia de muy pocas leptospiras en sangre y LCR, y excreción de abundantes leptospiras en la orina. Esta fase puede durar hasta 30 días, o incluso meses o años. La mayoría de las complicaciones de la Leptospirosis se asocian con la localización de las leptospiras dentro de los tejidos durante la fase inmune, y por lo tanto, ocurren durante la segunda semana de la enfermedad.

Fase leptospirémica: La enfermedad se presenta repentinamente y se asemeja a una gripe de variada intensidad que dura entre 4 y 7 días. La fiebre puede ser bifásica, desapareciendo y volviendo luego de 1-3 días de remisión, indicando el inicio de la segunda fase (inmune). Los síntomas, además de fiebre, incluyen escalofríos, cefalea con dolor retro-orbital y fotofobia, mialgia en espalda y piernas, dolor abdominal, enrojecimiento de conjuntivas y erupciones en la piel (menos frecuentes).

Fase leptospirúrica. La enfermedad en esta etapa afecta órganos específicos, incluyendo meninges, hígado, ojos y riñón. La fiebre y mialgia son menos severos que en la primera fase y pueden durar de días a semanas. Alrededor del 75% de los pacientes experimentan jaquecas que no ceden con analgésicos, lo cual generalmente anticipa el comienzo de una meningitis.

A partir de este punto la enfermedad puede tomar dos presentaciones: **anictérica** o **ictérica**. En la primera, el síndrome clínico más importante es la meningitis aséptica, que aunque usualmente dura pocos días, también puede persistir hasta 1 o 2 semanas. La falta de síntomas específicos puede hacer que se sospeche de una meningitis viral. Con menor frecuencia aparecen cambios en la conciencia y/o encefalitis. Si bien los síntomas meníngeos se presentan en el 50% de los pacientes, la muerte es extremadamente rara en la presentación anictérica de la enfermedad.

Entre el 5 y 10% de todos los pacientes con Leptospirosis desarrollan la forma ictérica de la enfermedad, también conocida como **Síndrome de Weil**, que es la más severa. Tiene una tasa de mortalidad alta de 15-40%. Se caracteriza por la aparición de ictericia, falla renal y hemorragias [27]. La ictericia es la coloración amarillenta de la piel y las mucosas debida a un aumento de la bilirrubina. En la Leptospirosis, la ictericia no se asocia con la necrosis hepatocelular sino a la colestasis (detención del flujo de bilis hacia el duodeno) debida a la sepsis, por lo que la función del hígado vuelve a la normalidad luego de la recuperación del paciente [25, 28]. La etapa ictérica puede ser acompañada por dolor abdominal, diarrea, constipación, hepatoesplenomegalia, náuseas, vómitos y pérdida del apetito. Entre el 2 y 10% de los casos pueden presentar otras complicaciones como uveítis, que puede ocurrir durante la enfermedad o hasta 1 año después [29, 30]. La hemorragia subconjuntival es la complicación oftalmológica más frecuente de la Leptospirosis, ocurriendo en el 92% de los pacientes, y las leptospiras pueden estar presentes en el humor acuoso. Aunque no existe correlación entre síndromes clínicos y serotipos involucrados, se ha observado que la ictericia está presente en el 83% de los pacientes infectados con el serovar Icterohaemorrhagiae y en el 30% de los pacientes infectados con Pomona.

El riñón es uno de los órganos más afectados ya que es donde se alojan las leptospiras, y la Leptospirosis es una causa común en los casos de falla renal aguda, reportado en el

16-40% de los casos [31-33]. Síntomas renales tales como azotemia, hematuria, proteinuria y oliguria están presentes en el 50% de los pacientes con Leptospirosis. La oliguria es un predictor significativo de muerte [34].

Las manifestaciones pulmonares pueden ocurrir en el 20-70% de los pacientes [25]. Los síntomas pueden ser leves como tos y disnea, o más severos como el síndrome de distrés respiratorio agudo [35-37]. La hemorragia pulmonar puede ser muy severa y causar la muerte [38-40].

1.2.5. Respuesta inmune

Innata

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa del huésped contra cualquier organismo extraño. El sistema de complemento forma parte de la respuesta innata jugando un rol esencial, y la activación de la vía alternativa de este sistema es uno de los mecanismos efectores más importantes durante las primeras horas de una infección. Sin embargo, este mecanismo no resulta eficiente frente a las leptospiras. Se ha observado en estudios *in vitro* que mientras la saprófita *L. biflexa* muere en pocos minutos en presencia de suero normal humano (no inmune), las especies patogénicas de *Leptospira* son capaces de sobrevivir y de resistir la acción lítica del sistema de complemento, especialmente si son virulentas [9].

Los receptores TLR (del inglés, *Toll-like receptors*) son proteínas que reconocen patrones comunes en la superficie de diversos microorganismos y se expresan diferencialmente en diferentes tipos celulares, entre ellos, neutrófilos y macrófagos. El LPS “clásico” de las enterobacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*) activa las células a través del receptor TLR4 para producir citoquinas pro-inflamatorias y respuesta a quimioquinas [41]. *Leptospira spp.* es peculiar porque expresa LPS en su superficie celular, mientras que otras espiroquetas, como las especies estrictamente parasíticas *Borrelia* y *Treponema*, carecen de él [25]. Sin embargo, el LPS de *Leptospira* posee un lípido A con una estructura diferente al de las enterobacterias. El lípido A es la porción del LPS que está anclada a la membrana bacteriana, y es el componente activo responsable de la actividad tóxica del LPS y de sus funciones. El LPS de

Leptospira es reconocido por los heterodímeros TLR4/TLR2 en las células murinas, pero las células humanas no se activan a través del TLR4, sino a través de los heterodímeros TLR2/TLR1, posiblemente debido a la estructura inusual del Lípido A [42]. Es importante notar que el TLR4 es crucial para controlar la Leptospirosis murina, ya que los ratones C3H/HeJ, que no expresan TLR4 (debido a una mutación espontánea) resultan susceptibles a la infección, mientras que el resto de las cepas de ratones presentan diferentes grados de resistencia.

En muchos estudios *in vitro* se ha demostrado que la fagocitosis de las leptospiras por neutrófilos y macrófagos sólo es efectiva si el patógeno es primeramente opsonizado por anticuerpos IgG específicos, de lo contrario la fagocitosis es mínima o incluso inexistente [43-46]. Por lo tanto, como generalmente las infecciones se producen en individuos no inmunes, la fagocitosis no es efectiva para eliminar las leptospiras. No obstante, las leptospiras (saprófitas en mayor medida que las patógenas) son susceptibles a los componentes de los gránulos primarios, el peróxido de hidrógeno y los péptidos catiónicos que son liberados por los neutrófilos bajo estimulación [47-49]. En años recientes, se ha descrito una nueva función antimicrobiana de los neutrófilos denominada NETosis (del inglés, *Neutrophil Extracellular Traps*), que consiste en la liberación de la cromatina junto con componentes de los gránulos, histonas y algunas proteínas citoplasmáticas, para inmovilizar o matar patógenos extracelulares [50]. Este proceso está siendo muy estudiado, pero aún no se conoce su efecto sobre las leptospiras.

Adquirida

Como las leptospiras son patógenos extracelulares, la respuesta inmune adquirida depende de la producción de anticuerpos. La infección por *Leptospira* produce una respuesta humoral con producción de inmunoglobulinas (Ig) IgM e IgG que son específicas de serovar. Si bien la producción de IgG es inconstante durante el transcurso de la enfermedad, la respuesta humoral puede ser detectada mediante el *test de aglutinación microscópica* o MAT (del inglés, *microscopic agglutination test*) a partir de los 5 a 7 días post-infección (d.p.i.). El título llega a su máximo en las semanas posteriores y permanece de meses a años, aunque puede verse afectado por el tratamiento. El MAT es el test serológico más importante y más utilizado para el diagnóstico definitivo de la Leptospirosis. Sin embargo, sólo los

laboratorios especializados pueden realizarlo porque para ello se debe contar con una colección de cultivos de diferentes especies y serovares de leptospiras con los cuales poder testear la aglutinación de los sueros de los pacientes. En la Leptospirosis, la mayoría de los anticuerpos específicos que se producen son contra el LPS leptospiral, el antígeno más destacado, aunque su potencial endotóxico es mucho menor comparado al LPS de las bacterias Gram-negativas. Otros componentes de la membrana también son antígenos importantes, como las lipoproteínas.

Si bien la inmunidad mediada por la respuesta humoral (linfocitos B) es muy importante para conferir protección contra la Leptospirosis, se conoce menos acerca de la inmunidad mediada por la respuesta celular (linfocitos T). Los linfocitos B son muy importantes para la eliminación de las leptospiras del huésped, un mecanismo que depende de los receptores TLR2 y TLR4 en ratones, y esta respuesta está compartimentalizada [51]. Mientras que en la circulación se produce IgM dependiente de TLR4, en el hígado se produce interferón gamma (IFN γ) dependiente de TLR2/4. También se ha demostrado que *Leptospira* activa los linfocitos T y las células renales parenquimales del riñón para producir IFN γ e iNOS (sintasa inducible de óxido nítrico). Inicialmente, esto genera una inflamación que es necesaria para atraer leucocitos y matar a las bacterias, pero se ha visto que las células B y T también participan en los procesos pro-inflamatorios que son independientes de los TLRs y que contribuyen al daño de los tejidos [8] (**Figura 1.5**).

Las leptospiras han desarrollado mecanismos de evasión de la respuesta inmune que le permiten llegar a los tejidos de órganos distantes como los pulmones, el hígado, el bazo y los riñones, y colonizarlos. Estos mecanismos incluyen la resistencia a la lisis por complemento y a la fagocitosis por células polimorfonucleares (neutrófilos) y macrófagos, los cuales serán discutidos a continuación.

1.2.6. Patogénesis: invasión de tejidos y evasión de la respuesta inmune

Las leptospiras utilizan diferentes estrategias para invadir los tejidos. Una de ellas es la capacidad de adherirse a las células del huésped y a la matriz extracelular o ECM (del inglés, *extracellular matrix*) como lo hacen otros patógenos. Las leptospiras virulentas, pero

no las atenuadas, se adhieren a líneas celulares cultivadas *in vitro*, como fibroblastos, monocitos/macrófagos, células endoteliales y epiteliales renales. Se han identificado varias adhesinas expresadas en la superficie de *Leptospira* que se unen a componentes de la matriz extracelular, como por ejemplo, colágeno tipo I y IV, laminina y fibronectina [52, 53]. Una de estas proteínas, LenA, es capaz de unirse al plasminógeno humano, el cual es convertido en plasmina que degrada la fibrina. De esta manera, la generación de plasmina podría facilitar la diseminación de *Leptospira* a través de los tejidos del huésped [54]. Todas las adhesinas identificadas se expresan sólo en la superficie de leptospiras virulentas, y algunas de ellas sólo bajo ciertas condiciones fisiológicas de temperatura, pH y osmolaridad. Por otro lado, diversos estudios con las espiroquetas patogénicas *Borrelia spp* y *Treponema spp*,

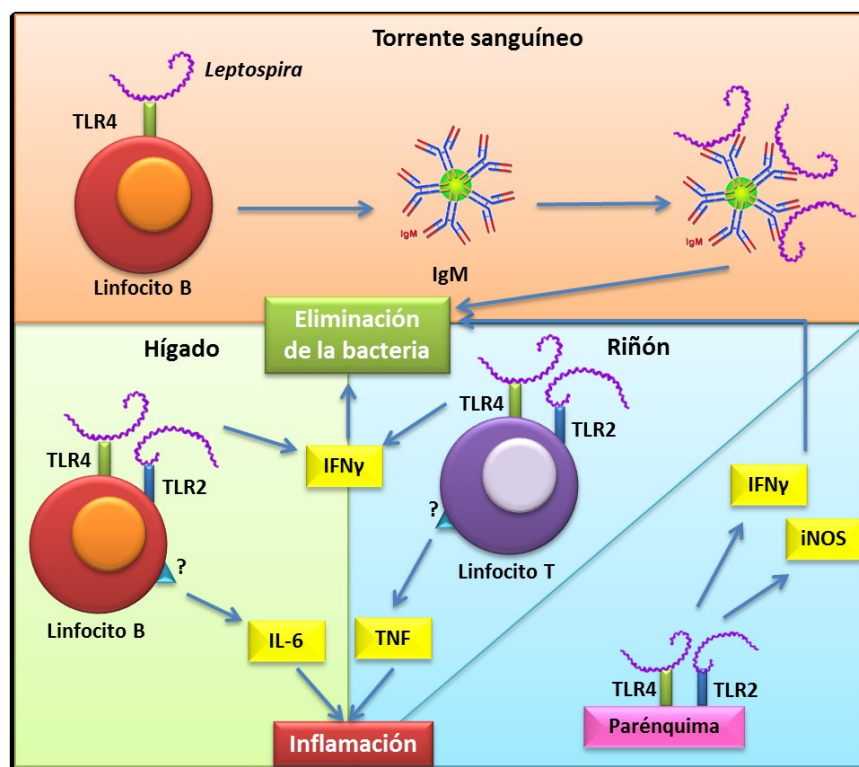


Figura 1.5. Modelo murino propuesto de activación compartimentalizada de TLR2 y TLR4 en la eliminación de *Leptospira*. En el torrente sanguíneo, la infección con *Leptospira* estimula las células B y lleva a la producción dependiente de TLR4 de IgM específica anti-LPS, que puede opsonizar la bacteria y promover su fagocitosis y muerte. Las bacterias que escapan la opsonización llegan a los riñones y al hígado, donde estimulan a las células B y T vía TLR2 y TLR4. Esta activación resulta en la producción de IFN γ , el cual promueve la fagocitosis y muerte de la bacteria. Incluso en el riñón, *Leptospira* activa las células renales parenquimales a través de TLR2 y TLR4 para producir IFN γ e iNOS, que también contribuyen a la eliminación de la bacteria. Además de estas respuestas protectoras, las células B del hígado y las células T de los riñones también son responsables de la inflamación independiente de TLR, a través de receptores desconocidos que reconocen *Leptospira*. Imagen adaptada de Werts (2010) [8].

han reportado la estimulación del endotelio vascular *in vitro* que conduce a un aumento en la expresión de moléculas de adhesión o CAMs (del inglés, *cell adhesion molecules*) [55, 56]. Las CAMs son receptores celulares de superficie presentes en células eucariotas que median las interacciones célula-célula o célula-ECM. Un número significativo de bacterias patógenas invaden los tejidos del huésped a través de su habilidad de unirse a estos receptores [57-59].

A diferencia de las bacterias Gram-negativas cuyo LPS es su principal factor de virulencia, en las leptospiras ese rol lo cumplen las lipoproteínas de la membrana externa [60]. El genoma de *L. interrogans* codifica más lipoproteínas que otros genomas no espiroquetales: se han identificado 184 genes que codifican lipoproteínas putativas, además de proteínas putativas extracelulares y de membrana externa u OMPs (del inglés, *outer membrane proteins*), las cuales están bien conservadas entre diferentes cepas pero la mayoría son de función desconocida. Recientemente se ha reportado que LipL32, la lipoproteína mayoritaria de membrana, la cual es altamente conservada entre leptospiras patógenas durante la infección aguda (aunque no es un prerrequisito para la virulencia), en realidad no está expuesta en la membrana externa sino que se encuentra en la sub-superficie [61, 62]. Hasta la fecha, se ha demostrado que sólo dos proteínas se comportan como verdaderos factores de virulencia: por un lado, la proteína Loa22, que activa la respuesta inmune en los pacientes, aumenta su expresión durante la infección aguda y se une a la ECM. Esto se ha confirmado mediante la interrupción del gen *loa22* con un trasposón, resultando en la pérdida total de la virulencia de *L. interrogans* [63]. Y por otro lado, la proteína HtpG (la homóloga bacteriana de la chaperona molecular altamente conservada Hsp90), que es importante en la respuesta al estrés de muchas bacterias. La interrupción del gen *htpG* con un transposón demostró que esta proteína es esencial para la virulencia de *L. interrogans* en el modelo de Leptospirosis aguda en hámster [64].

Por otra parte, se ha observado que las leptospiras son capaces de ingresar eficientemente a las células del huésped *in vitro* y traslocarse rápidamente a través de las monocapas celulares polarizadas sin alterar la resistencia eléctrica transepitelial, es decir, sin afectar su integridad [65]. Generalmente, permanecen dentro de estas células de manera transitoria, como por ejemplo se ha observado en una línea celular de macrófagos murinos, donde *L. interrogans* serovar Lai se localizó dentro de los fagolisosomas y luego fue eliminada

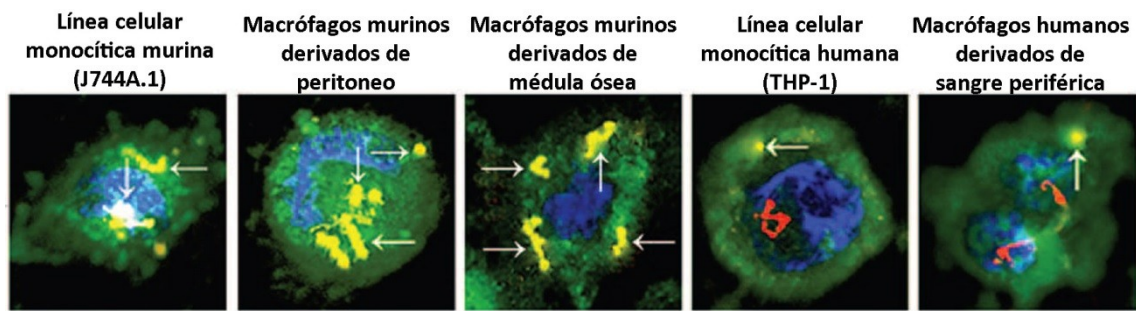


Figura 1.6. Co-localización de lisosomas y *L. interrogans* serovar Lai en macrófagos humanos y murinos. Las células se incubaron con la bacteria durante 4 horas, las leptospiras del medio extracelular se mataron con gentamicina y la co-localización se observó mediante microscopía confocal. El color rojo son las leptospiras intracelulares (en el citosol), el verde es el marcador lisosómico LAMP-1 y el azul es el núcleo. El color amarillo muestra la co-localización de las leptospiras (rojo) con LAMP-1 (verde), y se indica con flechas. Esta imagen parcial fue adaptada de Shijun Li et al (2010) [3].

por la maquinaria lítica de la célula [3]. Sin embargo, en ese mismo trabajo se vio que en una línea celular de macrófagos humanos *L. interrogans* serovar Lai replicaba en el citosol de las células, y luego inducía la apoptosis celular con liberación de las bacterias al medio extracelular (**Figura 1.6**). Los autores sugirieron que en un entorno no inmune, es decir, en ausencia de anticuerpos específicos, las leptospiras ingresarían a los macrófagos humanos de manera activa a través de mecanismos que aún se desconocen, transformando a estas células en reservorios de bacterias. La ausencia de activación del TLR4, junto con la localización citosólica de las leptospiras virulentas y la inducción de la apoptosis de los macrófagos, podrían contribuir a la susceptibilidad a la Leptospirosis en humanos, en contraste con la resistencia de los ratones. No obstante, es probable que este comportamiento diferencial de las leptospiras en macrófagos de diferentes huéspedes dependa también del serovar. Por ejemplo, un estudio con *L. interrogans* serovar Manilae en macrófagos murinos derivados de médula ósea demostró que esta bacteria era capaz de sobrevivir y replicar dentro de compartimentos en estas células, y ser liberada al espacio extracelular sin producir muerte celular [66].

Como se ha mencionado anteriormente, las leptospiras evaden la respuesta inmune innata del huésped durante las etapas iniciales de la infección escapando a la fagocitosis y a la muerte por la acción del complemento [9]. Se ha observado que varias cepas de leptospiras patogénicas activan el complemento a través de la vía alternativa, pero permanecen viables luego de la exposición a la proteína C reactiva humana. Esta resistencia está vincula-

da a la capacidad de unir el factor H y la proteína 1 relacionada al factor H (FHR-1), que es el principal regulador de la vía alternativa del complemento [67] (**Figura 1.7**). Además, se han encontrado cepas patogénicas resistentes al suero que son capaces de unir la proteína C4BP, un regulador muy importante en la vía clásica de la cascada del complemento [68]. Hasta la fecha, sólo algunos patógenos son conocidos por unir el factor H y C4BP: *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, y las espiroquetas *Borrelia recurrentis* y *Borrelia duttonii*.

Otro mecanismo de virulencia es la movilidad y la capacidad de desplazarse a través de medios viscosos, factor importante durante la infección inicial y la diseminación hacia órganos distantes [18]. También se ha demostrado que las cepas virulentas, pero no las avi-

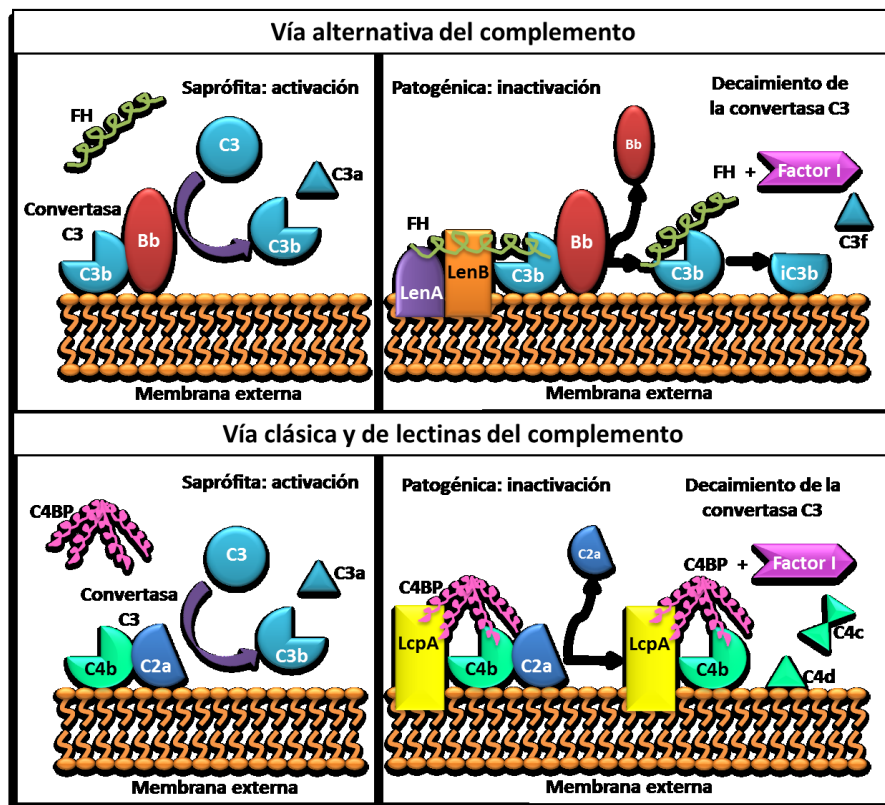


Figura 1.7. Estrategias de evasión del complemento. La *Leptospira* saprófita es susceptible a la muerte mediada por complemento porque no une las proteínas reguladoras del complemento del huésped, el Factor H (FH) y la proteína de unión a C4b (C4BP). En cambio, la *Leptospira* patogénica evade el ataque del complemento al adquirir en su superficie estas proteínas solubles. FH inhibe la vía alternativa impidiendo que el Factor B (Bb) se una a C3b, acelerando el decaimiento de la convertasa C3 y promoviendo el clivaje de C3 por el Factor I. C4BP inhibe la vía clásica del complemento (y la de lectinas) interfiriendo con el ensamble de la convertasa C3, acelerando su decaimiento y promoviendo la inactivación proteolítica de C4b por el Factor I. LenA/LenB y LcpA son ligandos leptospirales para el FH y C4BP humanos, respectivamente. Imagen adaptada de Fraga et al (2010) [9].

rulentas ni saprófitas, exhiben quimiotaxis hacia la hemoglobina [69]. En este sentido, se han identificado hemolisinas y proteínas similares a esfingomielinasas en el serovar Lai [25].

Las hemorragias son comunes en la Leptospirosis, pero aún no se ha elucidado su patofisiología con claridad. El sangrado podría ser resultado de un defecto en la hemostasia primaria o un desbalance de la hemostasia secundaria debido a la depleción de las proteínas de la coagulación [70]. La trombocitopenia es una característica bien documentada de la Leptospirosis y tiene una alta incidencia, pero se desconoce su mecanismo y existen controversias entre varios autores. Varios genes de *L. interrogans* codifican proteínas con una homología cercana a proteínas de origen animal que poseen roles importantes en la hemostasia [71]. Entre estas proteínas se encuentra una proteína similar a la acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas (PAF) de mamíferos, un ortólogo de paraoxonasa (que hidroliza el PAF) y dos proteínas con homología al dominio tipo A del factor von Willebrand (vWF), que primeramente fueron descritas en el serovar Lai, y son las proteínas **BatA** y **BatB**. Todas estas proteínas, en conjunto con una colagenasa que también se ha identificado en el genoma de *L. interrogans*, podrían contribuir a la pérdida de la hemostasia en la Leptospirosis.

1.3. Modelos animales

El modelo de Leptospirosis en el *Golden Syrian* hámster está bien caracterizado y presenta varias ventajas, incluyendo una susceptibilidad a un amplio rango de cepas patógenas de *Leptospira* [72]. La infección fulminante y diseminada que se observa en los hámsters es el típico patrón de la enfermedad observada en huéspedes accidentales, por lo cual resulta un modelo apropiado para estudiar la forma severa de la Leptospirosis humana. Sin embargo, las herramientas de biología molecular son limitadas para esta especie animal. Los cobayos y los gerbos también se utilizan como modelos para estudiar la infección accidental fulminante, aunque poseen la misma limitación que los hámsters [73]. Por otro lado, las ratas y los ratones, que son reservorios naturales de la bacteria, son típicamente resistentes a la Leptospirosis experimental una vez que alcanzan la madurez inmunológica. No obstante, esta resistencia se presenta en distintos grados en los ratones (según la cepa) y pueden desarrollar una infección subletal en los túbulos renales [74], mientras que las ratas

se utilizan como modelos de colonización renal persistente [75]. Por último, los primates reproducen la infección de manera similar a la observada en humanos, por lo que se los emplea para estudiar el síndrome hemorrágico pulmonar que se desarrolla con la forma severa de Leptospirosis [76].

1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la Leptospirosis es dificultoso debido a la diversidad de signos clínicos que presentan los pacientes, los cuales pueden confundirse con otras enfermedades, y depende de una variedad de ensayos de laboratorio como la detección de anticuerpos específicos mediante MAT, hemaglutinación indirecta (IHA) o por ensayos inmuno-enzimáticos (ELISA). Las leptospiras o sus componentes pueden detectarse en la orina y los tejidos realizando cultivos, o por microscopía de campo oscuro, inmunofluorescencia indirecta, inmunohistoquímica o PCR [10, 18, 25]. Los cultivos crecen muy lentamente, por eso sólo pueden reportarse como negativos después de un mínimo de 6-8 semanas si no se ha observado crecimiento. No obstante, si se sospecha que el paciente padece la enfermedad, debe comenzarse con el tratamiento antibiótico mientras se espera la confirmación.

El MAT es la prueba de diagnóstico serológico de referencia, ya que tiene como ventaja la elevada especificidad entre serovares, o al menos serogrupos, y alta sensibilidad. Sin embargo, no permite discriminar entre anticuerpos generados por la infección o la vacunación, lo cual puede ser particularmente problemático en animales, por ejemplo al chequear si el ganado presenta la enfermedad antes de ser importado o exportado. Generalmente, se acepta que una infección se debe a *Leptospira* cuando el título MAT es ≥ 400 y el paciente ha estado en contacto con animales y presenta los signos clínicos característicos de la enfermedad (fiebre abrupta, dolores musculares, eritrosedimentación elevada, presencia de leucocitos en la orina, etc). Además, se deben tener en cuenta los factores epidemiológicos característicos: locación, temporada climática, lugar de trabajo, hábitat, realización de viajes a áreas endémicas, etc. En la actualidad, existen disponibles tests comerciales de diagnóstico, como el Dip-S-Ticks (PanBio, Maryland, EEUU), que detecta anticuerpos anti-leptospira.

Por último, debe realizarse un diagnóstico diferencial para descartar enfermedades con sintomatología similar a la Leptospirosis, como dengue, influenza, hepatitis vírica, fiebre hemorrágica viral, septicemia con ictericia u otras enfermedades semejantes prevalentes localmente, incluyendo diversas enfermedades eruptivas, paludismo, fiebre de origen desconocido, rickettsiosis (fiebre Q, tífus), borreliosis, brucelosis, toxoplasmosis, pielonefritis y fiebre amarilla.

1.5. Tratamiento

En ausencia de tratamiento específico, la mayoría de los casos de Leptospirosis aguda acaban resolviéndose espontáneamente. Sin embargo, cuando se cuenta con un diagnóstico, aunque sea de presunción, se comienza el tratamiento antimicrobiano con antibióticos bajo internación del paciente. Se administra doxiciclina para tratar la forma leve de la enfermedad (también puede utilizarse como profiláctico en personas en condiciones de riesgo). La ampicilina y la amoxicilina también son utilizadas en estos casos. En personas con Leptospirosis severa, el tratamiento se realiza con penicilina G (cada 4 horas por vía parenteral) y ampicilina en dosis más altas [25]. En los pacientes alérgicos a la penicilina, se administra ceftriaxona o tetraciclina. La ceftriaxona tiene como ventaja que puede administrarse en menor frecuencia (una vez al día) y la inoculación puede ser intravenosa o intramuscular. Además, no es infrecuente la diálisis renal en estos pacientes, ya que las leptospiras colonizan los túbulos proximales renales, donde evaden al sistema inmune y se multiplican.

1.6. Medidas de control y prevención

La prevención de la Leptospirosis es difícil sin vacunación. La Organización Mundial de la Salud recomienda la notificación inmediata de los casos sospechosos o confirmados a nivel periférico (en hospitales o laboratorios), y la investigación de todos ellos. De esta manera, la vigilancia con base en hospitales permite obtener información sobre los casos más graves y conocer cuáles son los serovares de *Leptospira* prevalentes en cada región.

Las recomendaciones de higiene ocupacional, como trajes protectores y evitar las salpicaduras de agua u orina (por ejemplo, en la ganadería), son generalmente útiles pero difíciles de implementar porque impiden el trabajo o son inaceptables para los trabajadores o empleadores.

Las vacunas para humanos y animales han sido utilizadas desde el año 1920; la mayoría preparadas a partir de células enteras de *Leptospira* muertas por una variedad de métodos, incluyendo calor, formalina, fenol e irradiación [18]. El uso de leptospiras viables avirulentas, atenuadas o saprófitas no ha tenido aceptación. No obstante, se han utilizado vacunas para humanos conteniendo leptospiras enteras muertas en China, luego de inundaciones que resultaron en la exposición de grandes poblaciones al riesgo de contraer Leptospirosis [1].

En general, las vacunas contienen dos o tres serovares prevalentes localmente. Por ejemplo, en Cuba se logró producir una vacuna bacteriana trivalente para humanos (vax-SPIRAL) que contiene los tres serogrupos de leptospiras patógenas que circulan con mayor frecuencia en ese país (*Canicola*, *Pomona* e *Icterohaemorrhagiae*) [77]. Desde 1997, este preparado de células inactivadas de *Leptospira*, adsorbidas en un gel de hidróxido de aluminio, brinda una protección superior al 70% de los inmunizados y su aplicación está recomendada en personas con riesgo de exposición a partir de los 15 años de edad.

La vacunación del ganado puede reducir la excreción de orina y el riesgo de los trabajadores, especialmente si se acompaña de programas de concientización e higiene en la comunidad, y el apoyo de las autoridades responsables de la administración de la salud pública humana y veterinaria. Se encuentran disponibles vacunas comerciales para vacas, cerdos y perros. Por ejemplo, la vacuna anti-leptospirosis para el ganado bovino producida por el Centro Diagnóstico Veterinario (CDV, Argentina), que contiene tres serovares de *L. interrogans* inactivados (*Pomona*, *Wolffi*, y *Tarassovi*); o la vacuna Leptavoid-H® (México) que está formulada con cultivos inactivados de *L. interrogans* serovar Hardjo (*Hardjo prajitno*) y *L. borgpetersenii* serovar Hardjo (*Hardjo bovis*). Para los perros, en el país se encuentra disponible la vacuna inactivada bivalente Nobivac® Lepto, que contiene los serovares *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* de *L. interrogans*. En todos los casos, se recomienda la vacunación anual repetida para mantener la inmunidad y, como sucede con la infección natural, la in-

munidad está restringida a los serovares relacionados antigénicamente con aquellos incluidos en las vacunas.

1.7. Impacto socio-económico

La Leptospirosis es un problema económico de suma importancia para la salud pública y para la industria agropecuaria, ya que el tratamiento de los pacientes requiere hospitalización y frecuentemente diálisis renal, mientras que en el ganado induce abortos, partos prematuros, infertilidad, reducción de la producción de leche, pérdida de peso y hasta muerte [78]. Como la Leptospirosis produce en el ganado una infección crónica, la industria agropecuaria sufre una pérdida económica adicional cuando se aplican regulaciones de cuarentena a nivel nacional y/o internacional. Por la correlación directa con la situación económica, y al afectar a países agroexportadores, no sorprende que tenga un fuerte impacto en un país como la República Argentina.

1.8. Prevalencia e incidencia en la República Argentina

En la República Argentina, la incidencia en la población humana es de aproximadamente 18% de positividad serológica frente a *Leptospira spp.* cuando se evalúan sueros de pacientes sospechosos. Por el contrario, el porcentaje varía entre el 2 y el 6% en la población general (comúnmente no expuestos al riesgo de contraer Leptospirosis). Aproximadamente el 28% de los casos clínicos detectados corresponde a áreas densamente pobladas, razón que clasifica a la enfermedad como una zoonosis urbana importante de notificación obligatoria, pudiendo presentarse tanto en forma esporádica como en brotes epidémicos [79].

Los brotes más importantes ocurridos en nuestro país fueron en 1976 (Buenos Aires), 1998 (Santa Fe), 2003 (Santa Fe) y 2007 (Santa Fe y Entre Ríos) (**Figura 1.8**); éste último ha sido el más importante, reportándose más de 700 casos. En los primeros 2 meses del año 2010, se informaron 32 casos en la provincia de Santa Fe, 6 de los cuales resultaron fatales. Durante la década de 1970, se identificaron 12 serovares distintos en los pacientes infectados, aunque los serovares más frecuentes fueron Bratislava, Icterohaemorrhagiae y Butem-

bo. En el periodo 1984-1994, el 41% de los casos se debieron a infecciones con *L. interrogans* serovar Canicola.

En nuestro país, los reservorios más comunes son las ratas, los cerdos, los caballos y los perros. En Buenos Aires, el 25-40% de las ratas y el 10-60% de los perros son seropositi-

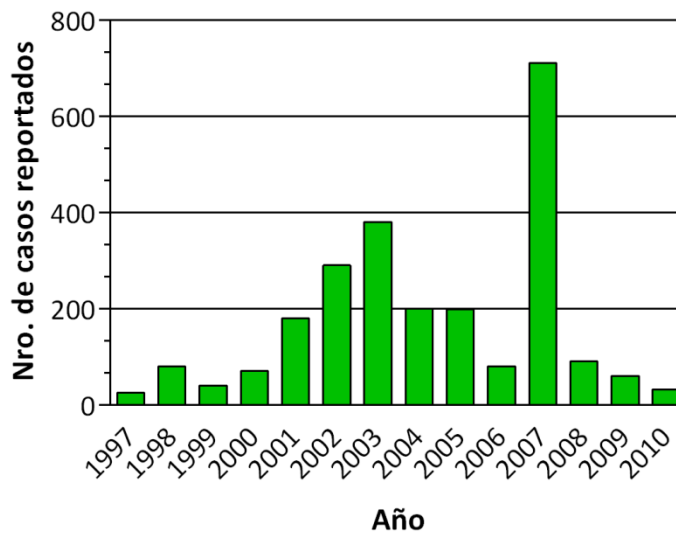


Figura 1.8. Casos reportados de Leptospirosis en Argentina entre los años 1997 y 2010. La mayoría de los casos fueron informados en Gran Buenos Aires y en las Provincias de Santa Fe, Entre Ríos, Córdoba y Neuquén. Imagen adaptada de la Base de Datos Guideon de Enfermedades Infecciosas.

vos para *Leptospira* spp, frecuentemente a los serovares Canicola y Pyrogenes.

OBJETIVOS GENERALES

Para este trabajo de Tesis se plantearon los siguientes objetivos generales:

- 1.** Caracterizar las proteínas BatA y BatB, y evaluar su rol en la patogénesis de *Leptospira interrogans*.
- 2.** Evaluar las consecuencias renales y humorales de la depleción de los neutrófilos en ratones infectados con *Leptospira interrogans*.
- 3.** Analizar la relación entre el polimorfismo del gen codificante para TLR2 humano y la susceptibilidad a la Leptospirosis.

Los objetivos específicos se detallarán en cada Capítulo.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS BatA Y BatB

CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS BatA Y BatB

2.1. Introducción

El secuenciamento completo de los genomas ha tenido un impacto enorme en el campo de la microbiología. Por ejemplo, el secuenciamento completo del genoma del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* representó una nueva estrategia para la identificación de candidatos vacunales, finalizando con cuatro décadas de esfuerzo continuo utilizando técnicas convencionales. Esta técnica, denominada ahora *vacunología reversa*, ha sido aplicada en los últimos años revolucionando el área de investigación en vacunas, ya que ha permitido el diseño de vacunas comenzando con la predicción de todos los antígenos *in silico*, independientemente de su abundancia y sin la necesidad de cultivar el microorganismo *in vitro* [80].

Actualmente hay seis secuencias genómicas de *Leptospira* publicadas: dos serovares de *L. interrogans* (Lai y Copenhageni), dos de *L. borgpetersenii* serovar Hardjo y dos cepas de *L. biflexa* serovar Patoc [22, 71, 81, 82]. El genoma de *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni (LIC) consiste de 2 cromosomas circulares con un total de 4.627.366 pb, correspondiendo 4.277.185 pb al cromosoma I y 350.181 pb al cromosoma II (**Figura 2.1**).

La diferencia más importante entre los genomas de *L. interrogans* y *L. borgpetersenii* es que éste último posee un número alto de pseudogenes, secuencias de inserción y acumulación de mutaciones puntuales disruptivas que se concentran en genes de percepción ambiental, transporte y utilización de metabolitos. Por esta razón, mientras que *L. interrogans* puede sobrevivir extensos pasajes en entornos acuáticos hasta encontrar un huésped mamífero, *L. borgpetersenii* sobrevive pobremente en el medio ambiente. Se ha concluido que *L. borgpetersenii* se encuentra en un proceso evolutivo hacia una dependencia estricta de un ciclo de transmisión huésped-huésped [81]. Por otra parte, la especie saprófita *L. biflexa* posee un tercer replicón circular de 74.000 pb (p74) que no está presente en las especies patógenas y que codifica para genes *housekeepers* o “maestros”. Se han encontrado ortólogos de estos genes en el cromosoma I de *L. interrogans*, lo cual sugiere que p74 es esencial para la supervivencia de *L. biflexa*.

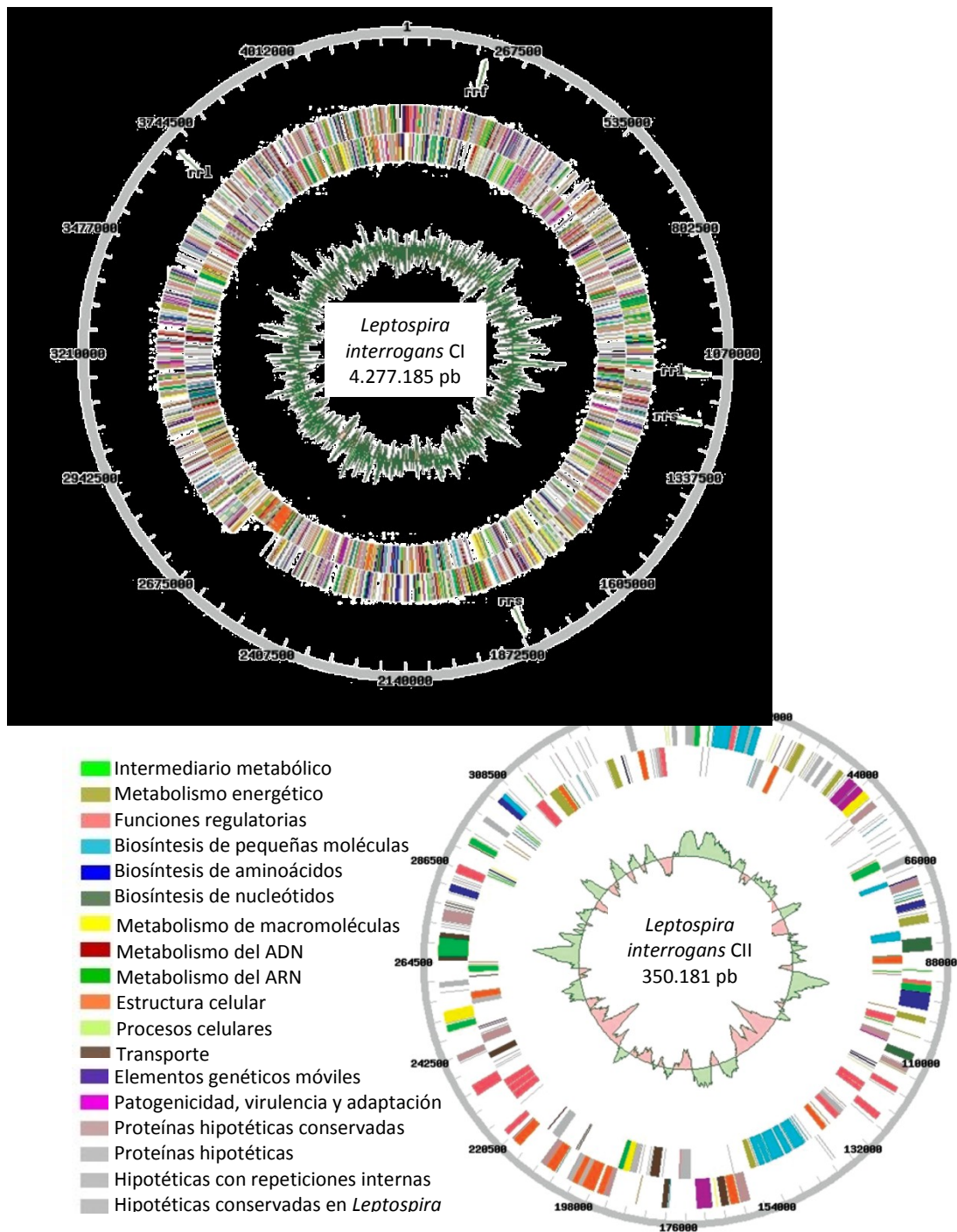


Figura 2.1. Mapa circular de los dos cromosomas de *Leptospira interrogans*. Los círculos 1 y 2 (de afuera hacia adentro) muestran todas las regiones codificantes (hebra directa y complementaria) en distintos colores, según su función; el círculo 3 muestra el contenido de G + C. Los números del círculo externo indican las pares de bases. Los genes del rRNA, rrl, rrs y rrf corresponden a las subunidades 23S, 16S y 5S, respectivamente. Nota: Los dos replicones no han sido dibujados a escala. El tamaño del cromosoma II (CII) es 12 veces menor con respecto al cromosoma I (CI). *Imagen adaptada de Nascimento et al (2004) [4].*

La comparación genómica de dos especies patógenas y una saprófita ha identificado 2052 genes comunes a todos, el genoma base de *Leptospira*, sugiriendo un origen común para todas las especies [1].

El análisis del genoma de LIC ha revelado diversos genes que podrían poseer valor ya sea como candidatos para diagnóstico, vacunales o por su posible rol en la patogénesis. Por ejemplo, se encontraron 263 posibles proteínas de membrana expuestas en la superficie, aunque sólo unas pocas, aún hoy, han sido caracterizadas a nivel molecular [4, 22]. Otros genes de interés son los que codifican para posibles lipoproteínas, ya que podrían activar al sistema inmune innato a través de receptores tipo *Toll* [14, 83]. En este sentido, se han identificado 184 lipoproteínas que podrían estar implicadas en la patogénesis de la enfermedad. La mayoría continúan siendo hipotéticas, es decir que no se han identificado en otro organismo, y sólo algunas docenas han sido publicadas [60, 62, 84-87]. Cabe destacar que hasta la fecha sólo se han descrito dos factores de virulencia, *Loa22* y *HtpG* [63, 64].

En este trabajo se propuso el estudio de dos proteínas hipotéticas (al momento de comenzar el estudio, ver más adelante), detectadas en la base de datos del Proyecto Genoma de *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni*. Se trata de las proteínas **BatA** y **BatB**, codificadas por los genes *lic20040* y *lic20041*, respectivamente. De aquí en adelante se referirá a ellas como **LIC20040** y **LIC20041** (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Genes de *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni* seleccionados *in silico*

Gen	% de identidad en otras <i>Leptospiras</i>	nts	aa	MM	PS	MM sin PS
<i>lic20040</i>	<i>L. interrogans</i> serovar <i>Lai</i> (100%), <i>L. interrogans</i> serovar <i>Pomona</i> (99%), <i>L. kirschneri</i> serovar <i>Bim</i> (95%), <i>L. biflexa</i> serovar <i>Patoc</i> (48%)	963	321	36.4	1-27	34.4
<i>lic20041</i>	<i>L. interrogans</i> serovar <i>Grippotyphosa</i> (99%), <i>L. kirschneri</i> serovar <i>Bim</i> (92%), <i>L. borgpetersenii</i> serovar <i>Hardjo-bovis</i> (81%)	1044	348	39.2	1-24	37.6

Nts: nucleótidos (en pares de bases, pb), aa: aminoácidos, MM: masa molecular (en kilo Daltons. kDa), PS: péptido señal (en aminoácidos).

Los genes *bat* fueron descritos por primera vez en un fenotipo mutante de la bacteria Gram-negativa *Bacteroides fragilis*, un bacilo anaerobio obligatorio que es la especie aislada con mayor frecuencia de las infecciones intraperitoneales e intra-abdominales en humanos [88, 89]. De entre las especies intestinales, *B. fragilis* es la que presenta mayor aerotolerancia ya que es capaz de sobrevivir largos periodos de exposición al oxígeno [90, 91]. Tang y colegas generaron una colección de células *B. fragilis* mutantes mediante la utilización de un transposón, y evaluaron el crecimiento de los mutantes individuales en cultivo de tejidos en monocapas [92]. Los candidatos que mostraron defectos en el crecimiento fueron evaluados para comprobar si presentaban alteraciones en la aerotolerancia, y así aislaron un mutante donde el transposón se había insertado en una proteína de 68 kDa. Esta proteína luego fue identificada como BatD, la cual se encuentra codificada dentro de un operón (*Batl*) que contiene otras cuatro proteínas dispuestas en tándem, denominadas BatA, BatB, BatC y BatE. Además, demostraron que estos cinco genes co-expresan, ya que inactivando cualquiera de ellos disminuía la aerotolerancia de la bacteria. Incluso, cuando el mutante era complementado con un plásmido que contenía el operón completo, los niveles de aerotolerancia volvían a elevarse. De allí que denominaran a estos genes “*bat*” por *Bacteroides aerotolerance genes*.

Todas estas proteínas contienen potenciales dominios transmembrana en sus extremos N-terminales, los cuales podrían servir de señales de exportación hacia la membrana de *B. fragilis*. Por otro lado, los genes *batC* y *batE* contienen secuencias similares a repeticiones tetratricopéptido (TPRs), los cuales son motivos comúnmente encontrados en interacciones proteína-proteína. En conjunto, los productos de estos cinco genes formarían un complejo de proteínas [92]. Debido a que el crecimiento del mutante en cultivo de tejidos en monocapa mejoró con la adición de agentes reductores al medio, los autores propusieron que las proteínas Bat podrían estar involucradas en la exportación de equivalentes de poder reductor al espacio periplásmico, o funcionar reduciendo proteínas periplásmicas específicamente, a la vez oxidando equivalentes de poder reductor en el citoplasma.

Las leptospiras, a diferencia de *B. fragilis*, son bacterias aerobias estrictas. Sin embargo, carecen de la mayoría de las enzimas necesarias para combatir el estrés oxidativo encontradas en otras especies de bacterias, y son más susceptibles que otros microorganismos a la muerte mediada por peróxido de hidrógeno (H₂O₂) [47]. Las especies reactivas del

oxígeno, incluyendo el H_2O_2 y los radicales superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH^-), son moléculas altamente reactivas que resultan perjudiciales para las bacterias, ya que inactivan proteínas y dañan el DNA y los lípidos. Se ha propuesto que las proteínas Bat de *Leptospira* podrían actuar compensando parcialmente esta falta de enzimas del estrés oxidativo, otorgando una línea de defensa adicional contra el daño por oxidación [22].

Se han encontrado homólogos de los genes *bat* en una variedad de procariotas, incluyendo todas las familias que comprenden el filum *Spirochaetes*, pero el número y la combinación de los genes varía según la especie. En *L. interrogans*, por ejemplo, sólo se encontraron 4 homólogos: *batA*, *batB*, *batC* y *batD* [4]. Los homólogos *bat* incluso están presentes en *L. borgpetersenii*, especie que aparentemente se encuentra atravesando una reducción en su genoma, lo cual sugiere que son genes que confieren ventajas evolutivas a las espiroquetas. Al igual que en *B. fragilis*, los genes *bat* de *L. interrogans* codifican para hélices transmembrana, péptidos señales potenciales y motivos de interacción proteína-proteína, siendo factible que formen un complejo multiproteico en el periplasma. Como excepción, no se han encontrado homólogos de los genes *bat* en la espiroqueta *Treponema pallidum*, el agente causal de la sífilis en humanos.

El principal interés en estudiar los genes *lic20040* (*batA*) y *lic20041* (*batB*) radica en que los mismos codifican proteínas con un dominio von Willebrand tipo A (vWA).

El factor von Willebrand (vWF) es una glicoproteína multimérica de alto peso molecular que es producida por las células endoteliales y los megacariocitos (precursores de las plaquetas), y es almacenada en gránulos. Su función es permitir que las plaquetas se adhieran de manera estable a la superficie de los vasos endoteliales dañados para que pueda formarse el coágulo sanguíneo primario. En condiciones fisiológicas normales, el vWF y otros componentes implicados en la coagulación (colágeno y el factor tisular) no son accesibles. Sin embargo, cuando se lesiona el endotelio, se exponen al flujo sanguíneo y las plaquetas los utilizan como ligandos para adherirse y activarse. Una vez activadas, las plaquetas comienzan a agregarse mediante la interconexión del vWF y fibrinógeno, formando un tapón plaquetario. De esta manera, la agregación de las plaquetas completa la hemostasia primaria y da paso a la hemostasia secundaria, también conocida como coagulación, que culmina con la reparación del vaso sanguíneo [93].

Las formas mutantes del vWF están implicadas en la etiología de diversos trastornos hemorrágicos (enfermedad de von Willebrand) [94]. Las proteínas que poseen dominios vWA participan en numerosos eventos biológicos, como adhesión celular, migración, formación de patrones y transducción de señales, que involucran la interacción con una gran variedad de ligandos [95]. Los dominios vWA son plegamientos Rossmann que consisten de una lámina β entre múltiples hélices α [96]. Muchos de estos dominios unen iones metálicos a través de un motivo de secuencia discontinua llamada “sitio de adhesión dependiente de ion metálico” (MIDAS). Recientemente, se han identificado dominios intracelulares vWA y homólogos en procariotas. De los 148 dominios procarióticos registrados en las bases de datos, 90 contienen las palabras “hipotético”, “putativo”, “marco de lectura abierto” u “ORF” (del inglés, *open reading frame*) o “desconocido” en sus descripciones, indicando que la mayoría están en proteínas de función desconocida.

Más del 80% de los dominios vWA procariotas tienen un motivo MIDAS imperfecto, indicando que la coordinación con un catión divalente podría ser importante en la función de la proteína. Entre las bacterias, se encontraron 132 proteínas con dominios vWA en 49 especies diferentes. La mitad de los genomas bacterianos carecen de proteínas con dominios vWA y, cuando están presentes, no son homólogos claros entre sí [97].

2.2. Objetivos específicos

Los objetivos de este trabajo fueron analizar la presencia de BatA y BatB en varios serovares de *Leptospira*, clonar los genes *lic20040* y *lic20041*, expresar las proteínas recombinantes BatA (LIC20040) y BatB (LIC20041), purificarlas y replegarlas a su conformación nativa. Una vez obtenidas las proteínas recombinantes, producir el suero policlonal anti-BatA y anti-BatB, analizar la antigenicidad de las proteínas utilizando suero convaleciente humano y también su expresión *in vivo*. Además, estudiar la localización celular de BatA y BatB, y caracterizar la actividad biológica de las proteínas recombinantes en plaquetas.

2.3. Resultados

2.3.1. Cultivo de diferentes cepas de *Leptospira*

Las leptospiras se cultivaron en medio EMJH a 30 °C durante un mínimo de 15 días, en aerobiosis y oscuridad. El crecimiento bacteriano se evidenció por la formación del característico anillo de Dinger en los medios semisólidos y turbidez del medio en los cultivos líquidos, confirmándose mediante visualización en microscopio de campo oscuro (**Figura 2.2**). Las cepas patogénicas cultivadas fueron *L. interrogans* serovar Copenhageni (L1-130), Canicola (Hond Utrecht IV), Grippotyphosa (Moskva V), Icterohaemorrhagiae (RGA) y Pomona (Pomona); las de patogenicidad intermedia, *L. borgpetersenii* serovar Ballum (Castellon Castellon 3) y Tarassovi (Perepelicin); y la especie saprófita *L. biflexa* serovar Patoc cepa Patoc I.

2.3.2. Análisis bioinformático

Los genes *lic20040* de 963 pb y *lic20041* de 1044 pb fueron identificados en el cromosoma II mediante análisis de los posibles ORFs en el genoma de *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni [4, 22]. Ambas proteínas fueron predichas como proteínas hipotéticas. **LIC20040**, llamada **BatA**, tiene un peso molecular supuesto de 36,4 kDa y 321 aminoácidos; mientras que **LIC20041** o **BatB** posee un peso molecular de 39,2 kDa y 348 aminoácidos. Según el servidor SMART, LIC20040 posee un péptido señal que se extiende del aminoácido

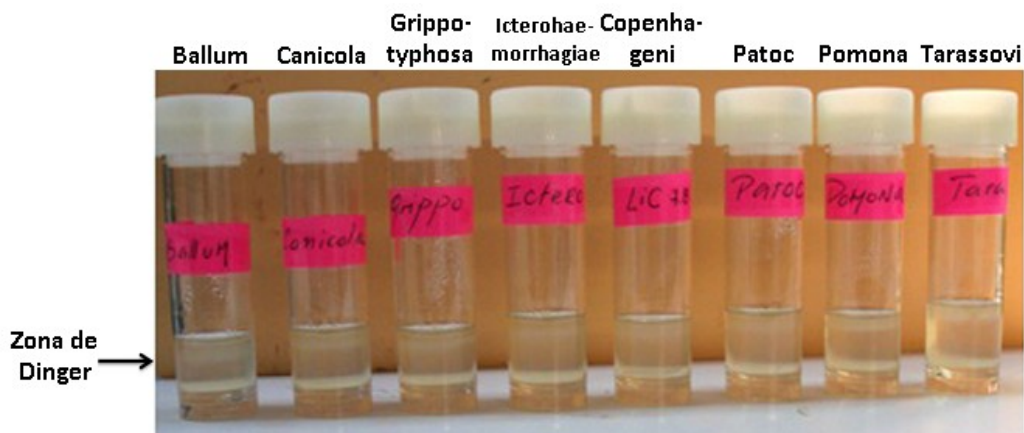
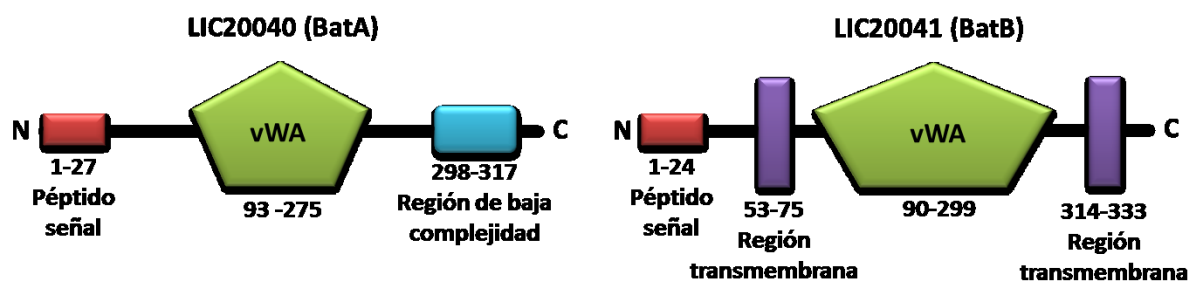


Figura 2.2. Cultivo de diferentes especies de *Leptospira*. Las bacterias se cultivaron en medio EMJH semisólido a 30 °C y aerobiosis. Nótese la formación del característico anillo de Dinger, donde se concentra el crecimiento bacteriano.

1 al 27, un dominio vWA entre los aminoácidos 93 y 275, y una región de baja complejidad entre los aminoácidos 298-317 (**Figura 2.3**). LIC20041 también presenta un péptido señal y un dominio vWA que se extienden entre los aminoácidos 1-24 y 90-299, respectivamente. Además, posee dos regiones transmembrana ubicadas entre los aminoácidos 53-75 y 314-333. Los dominios vWA, también predichos por el servidor PFAM, podrían tener un rol en la adhesión, la interacción proteína-proteína o la unión de ligandos.

Al momento de comenzar este estudio, la localización celular de estas proteínas no era clara. Por un lado, el servidor web PSORT predijo que ambas eran proteínas citoplasmáticas de membrana, y por otro lado, el servidor PredictProtein las identificó como proteínas periplásmicas. Este servidor clasificó a LIC20040 como una proteína mixta, teniendo una composición de estructura secundaria de 51,25% hélices alfas y 9,38% láminas beta. Además, 50,31% de los aminoácidos tienen el 16% de su superficie expuesta al solvente. LIC20041 también es una proteína mixta que se compone de 47,55% hélices alfas y 11,25% láminas beta, con una accesibilidad al solvente de 53,03%. El análisis de alineamiento de ambas proteínas mostró homólogos con 100% (LIC20040) y 99% (LIC20041) de identidad en *L. interrogans* serovar Lai. La **Tabla 6.2** (Capítulo VI) enumera los servidores empleados en el análisis bioinformático. Teniendo en cuenta que LIC20041 posee regiones transmembrana pero LIC20040 no, y que sus secuencias se encuentran codificadas en el mismo operón (ver Discusión), es posible teorizar que LIC20041 se encuentra atravesando la membrana interna de la bacteria con acceso al espacio periplásmico, y que interacciona con LIC20040 que se encuentra anclada a la cara interna de la membrana (en el citosol), directa o indirectamente (**Figura 2.4**).



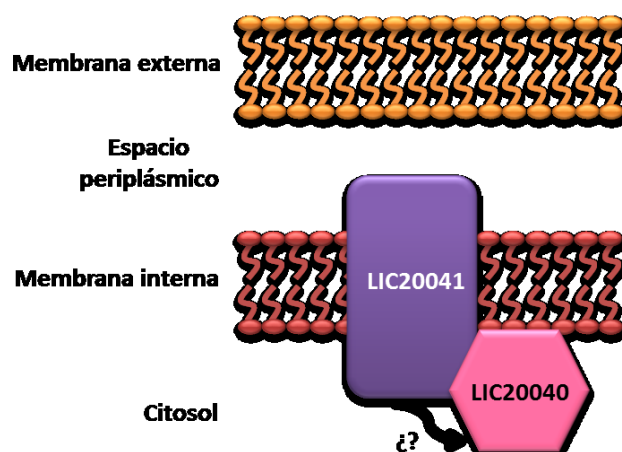


Figura 2.4. Representación esquemática de la localización de LIC20040 y LIC20041. La proteína LIC20041 atravesaría la membrana interna de *Leptospira* e interaccionaría con el periplasma y con LIC20040 en el citosol. La interacción podría ser directa o con ayuda de proteínas accesorias.

2.3.3. Distribución de los genes *lic20040* y *lic20041* y análisis transcripcional entre cepas de *Leptospira*

La presencia de los genes *lic20040* y *lic20041* en *L. interrogans* serovar Copenhageni, así como en otras 7 cepas de *Leptospira* (incluida la saprófita *L. biflexa* serovar Patoc) que fueron cultivadas en nuestro laboratorio, se examinó por PCR utilizando un par de oligonucleótidos diseñados según la secuencia del genoma de LIC, sin incorporar el péptido señal (**Tabla 6.3**, Capítulo VI). Fueron amplificados un producto de 906 pb correspondiente a LIC20040 y uno de 996 pb correspondiente a LIC20041 en todos los genomas, incluyendo la especie saprófita (**Figura 2.5A**).

La distribución transcripcional fue evaluada mediante amplificación por PCR de muestras de RNA total extraído de las mismas leptospiras mencionadas anteriormente, transcritas en reverso (RT-PCR) para obtener el DNA complementario (cDNA). En este caso, todas las cepas mostraron la presencia de los transcritos, con excepción del transcrito de *lic20040* en *L. interrogans* serovar Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae y Pomona (**Figura 2.5B**). El transcrito de *lic20041* amplificó tenuemente en *L. interrogans* serovar Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae. Se descartó la contaminación con DNA ya que no se observó amplificación en ausencia de transcriptasa reversa. Además, se constató la integridad del RNA total utilizado en el experimento de PCR con transcriptasa reversa por la presencia de

un fragmento de cDNA de 331 pb en todas las muestras, correspondiente al RNA 16s ribosomal (*rRNA 16s*).

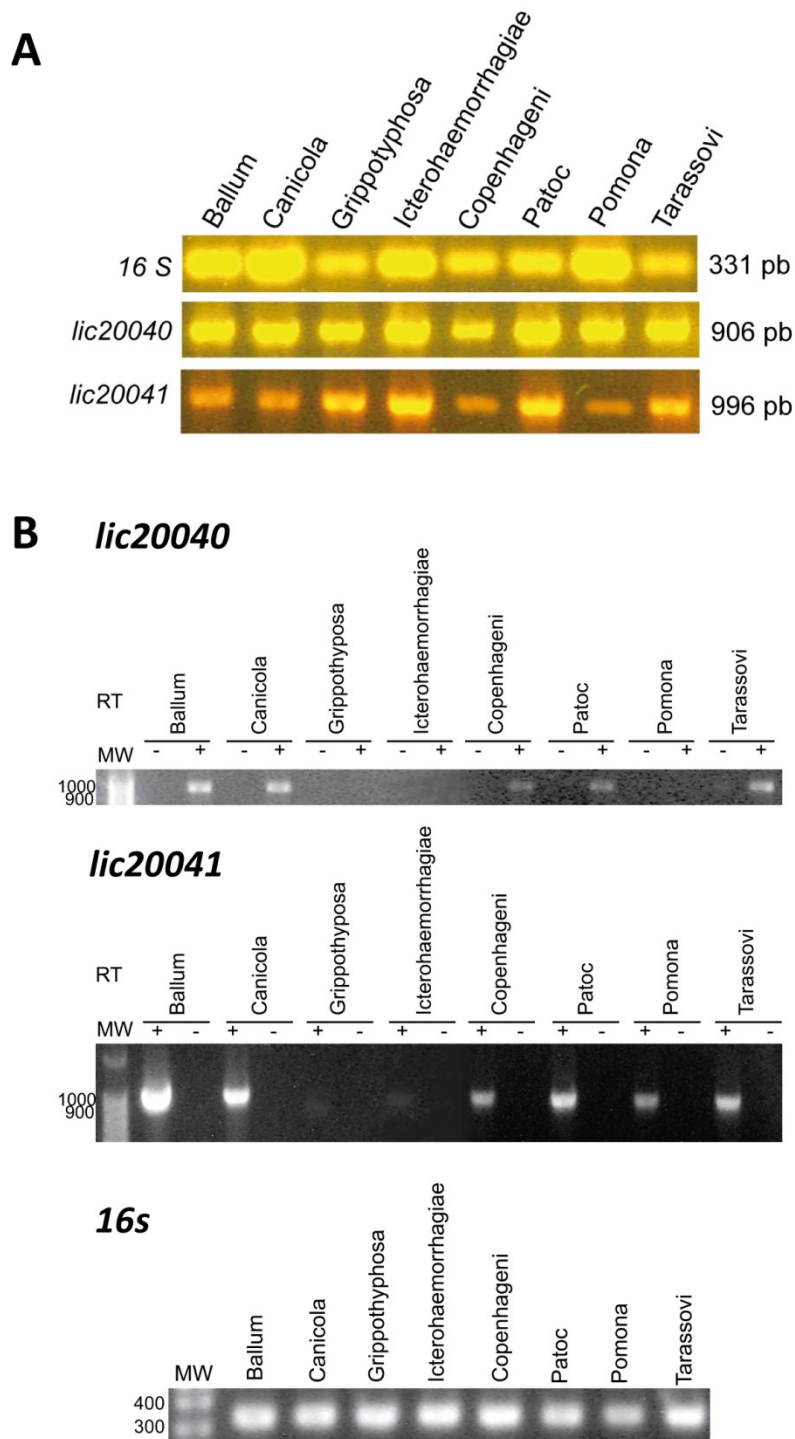


Figura 2.5. Análisis genómico y transcripcional de los genes *lic20040* y *lic20041* en diferentes cepas de *Leptospira*. **A)** Amplificación de los genes por PCR empleando oligonucleótidos específicos. **B)** RT-PCR de los genes utilizando los mismos oligonucleótidos, en presencia (+) o ausencia (-) de transcriptasa reversa. En ambos casos, se amplificó el gen *16s* del RNA ribosomal para comprobar la integridad de las muestras. MW= longitud en pares de bases.

2.3.4. Clonado, expresión y purificación

En primer lugar, se amplificaron los genes *lic20040* y *lic20041* por PCR con oligonucleótidos específicos y se clonaron en el vector comercial pGEM-T Easy. Luego, estos fragmentos de DNA fueron subclonados en el vector de expresión pAE [98] (**Figura 2.6**), verificando que el marco de lectura fuera correcto mediante secuenciación (**Figura 2.7**). A continuación, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes rLIC20040 y rLIC20041 en *Escherichia coli* BL21 (SI), como proteínas de fusión con una cola de 6 histidinas (6x His-Tag) en el extremo N-terminal.

Es conocido que en las expresiones heterólogas, las proteínas recombinantes que se producen en gran cantidad agregan formando “cuerpos de inclusión”, los cuales decantan con el resto de la fracción insoluble bacteriana [99]. Estos cuerpos de inclusión contienen la proteína recombinante de interés en un alto grado de pureza, aunque no en su forma plegada nativa. Por lo tanto, si bien resulta ventajoso recuperar la proteína de interés a partir de estos agregados, tienen como desventaja la necesidad de pasos posteriores de replegado.

En este trabajo, las fracciones insolubles que contenían los cuerpos de inclusión ricos en proteína recombinante fueron solubilizadas y purificadas mediante IMAC con una resina cargada con níquel. Este catión interactúa con las histidinas fusionadas a la proteína y las retiene mientras los contaminantes se eliminan, y luego la proteína recombinante es eluida por competición con imidazol, el cual también interactúa con el níquel [100].

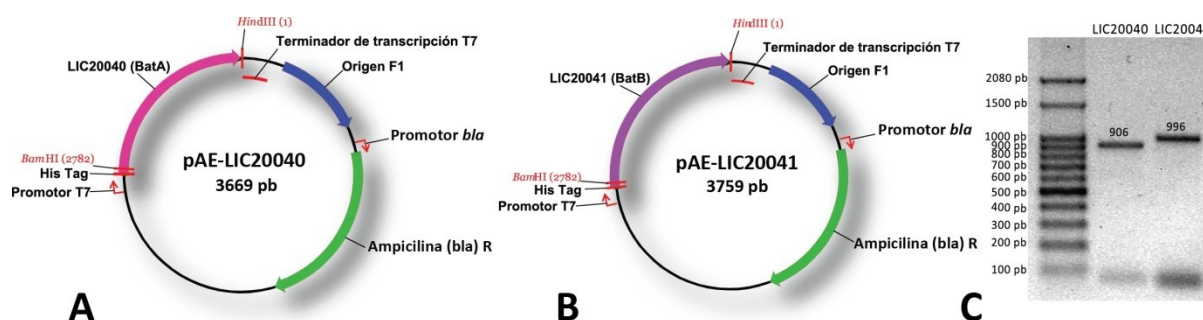


Figura 2.6. Construcción de los vectores de expresión. Luego de amplificar los marcos de lectura de los genes *lic20040* y *lic20041* (sin la secuencia del péptido señal) por PCR empleando oligonucleótidos específicos (C), se digirieron los fragmentos con las enzimas de restricción *BamH1* y *HindIII*, así como también el plásmido pAE. La ligación dio origen a las construcciones pAE-LIC20040 (A) y pAE-LIC20041 (B).

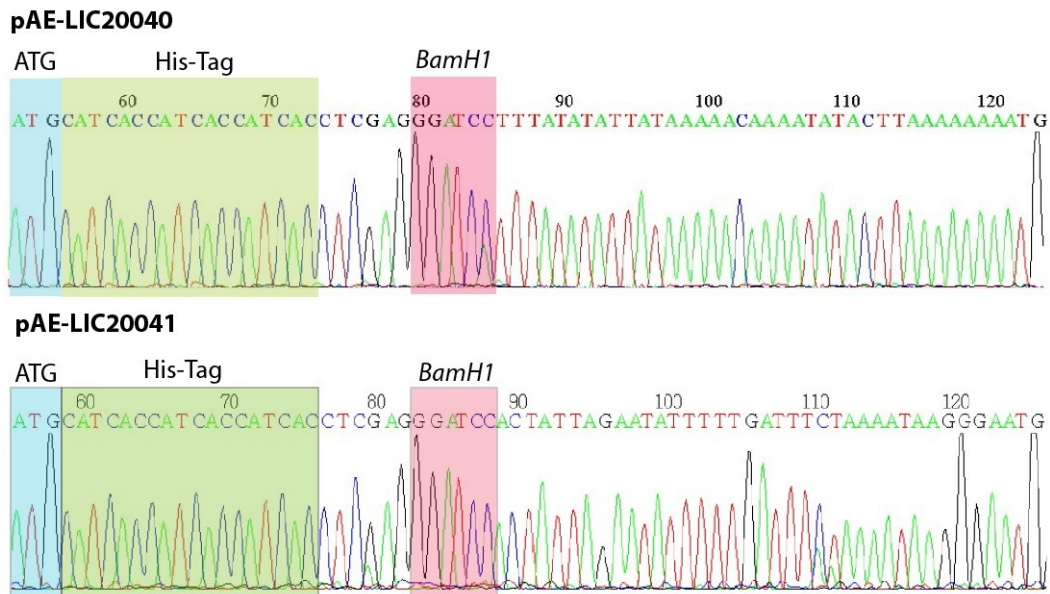


Figura 2.7. Cromatogramas representativos de secuenciación. Se verificó el marco de lectura de las construcciones pAE-LIC20040 y pAE-LIC20041. Se han resaltado el codón de inicio de traducción, la cola de 6 histidinas consecutivas (His-Tag) y la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *BamH1*.

Todas las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE 10%, donde se observó que sólo la proteína rLIC20040 pudo ser expresada. Las fracciones que contenían la proteína rLIC20040 se dializaron a fin de replegar la misma y obtenerla en su forma nativa (**Figura 2.8A**). La expresión se confirmó mediante Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti-HisTag, el cual reconoce de forma específica la cola de 6 histidinas fusionada a la proteína recombinante (**Figura 2.8B**).

Se intentó obtener la proteína rLIC20041 empleando otras cepas de bacterias como *E.coli* BL21 (DE3) o BL21 (DE3) pLysS. Las cepas DE3 contienen un profago λ que conlleva el gen de la RNA Polimerasa T7 y el gen inhibidor *lacI*. La expresión a partir de los plásmidos transformados que contienen un promotor T7 es reprimida hasta que el agregado de IPTG induce la RNA Polimerasa T7 de un promotor *lac*. Debido a que en ocasiones las proteínas recombinantes pueden resultar tóxicas para las células, y esto puede afectar el rendimiento de la expresión, resulta conveniente inhibir la expresión basal hasta que el cultivo haya alcanzado el crecimiento óptimo. Las cepas que contienen el plásmido pLysS codifican un fago T7 lisozima, el cual inhibe la T7 Polimerasa, eliminando casi por completo la expresión basal hasta el momento de la inducción. Se ensayaron diferentes condiciones de expresión, modi-

ficando la temperatura (4, 10, 25, 30 y 37 °C), el medio de cultivo (medio TB, que posee mayor concentración de triptona y contiene fosfatos) y la concentración de inductor (IPTG 0,5, 1 y 1,5 mM), sin embargo, no se pudo obtener la proteína rLIC20041.

Como última estrategia, se clonó el ORF de LIC20041 en el vector de expresión comercial pRSETa y se ensayaron las condiciones de expresión ya mencionadas, pero nuevamente no se observó expresión de la proteína. Por lo tanto, continuamos sólo con la caracterización de LIC20040.

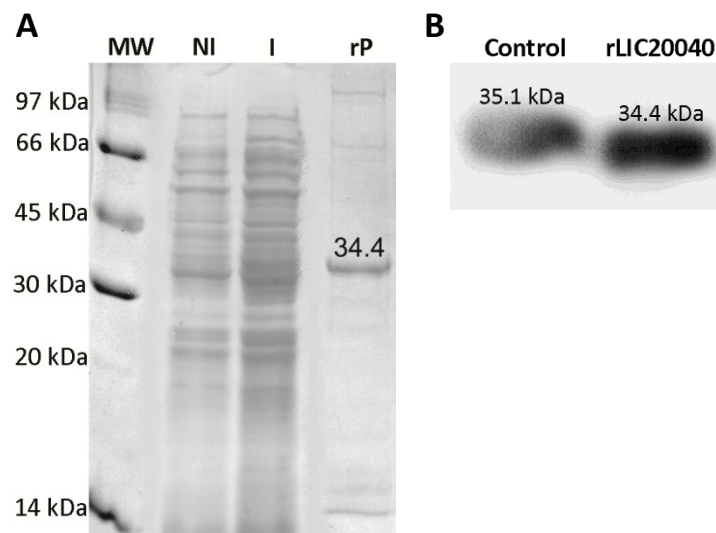


Figura 2.8. Expresión a 30°C y purificación de la proteína rLIC20040. **A)** SDS-PAGE 10% de muestras de cultivos de bacterias BL21 SI transformadas con el plásmido pAE-LIC20040, sin inducir (NI) o luego de 3 horas de inducción (I) con cloruro de sodio 0.3 M final, y purificación de la proteína recombinante (rP) mediante cromatografía de afinidad a metales (Ni^{+2} -NTA). MW= peso molecular. **B)** Western Blot de la proteína rLIC20040 replegada utilizando el anticuerpo anti-HisTag. La membrana se incubó con anti-mouse HRP y se reveló con OPD por luminiscencia (ECL). Como control positivo se utilizó la proteína recombinante Bsp22 de *Bordetella pertussis* fusionada a la toxina colérica B.

2.3.5. Producción de antisuero anti-LIC20040

Disponer de un suero capaz de reconocer a la proteína de interés es importante para su posterior caracterización. El antisuero se obtuvo administrando 10 µg totales (50 µg/ml) de la proteína rLIC20040 soluble a ratones BALB/c por vía subcutánea, con hidróxido de aluminio como adyuvante. Luego de cada inmunización, los ratones fueron sangrados y los sueros colectados se titularon por ensayo de ELISA (**Figura 2.9**). Se observó la presencia de anticuerpos anti-rLIC20040 a partir de la tercera inmunización, con la máxima titulación en la cuarta inmunización ($P < 0,0001$).

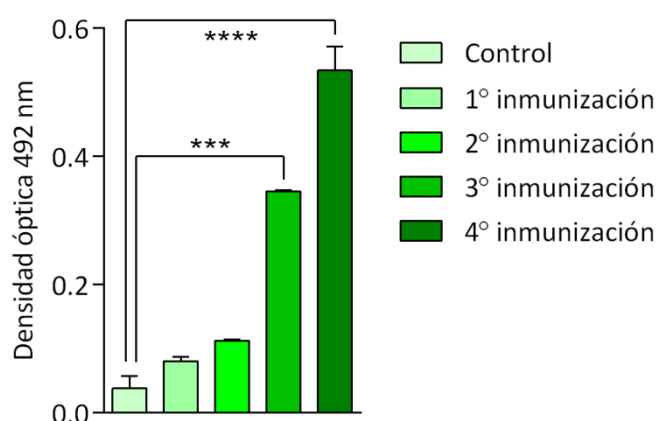


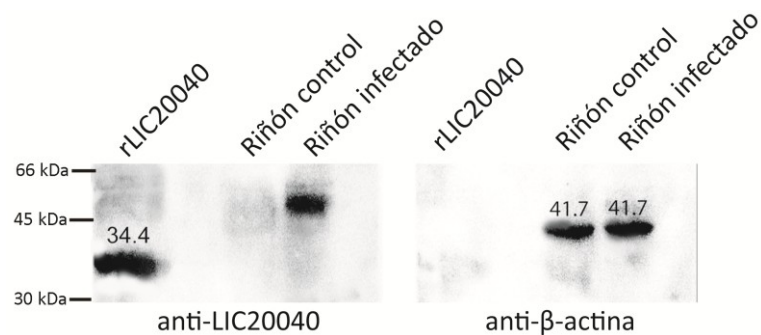
Figura 2.9. Titulación de los sueros obtenidos en las inmunizaciones de ratones Balb/c con la proteína rLIC20040. La placa fue sensibilizada con la proteína recombinante LIC20040 o BSA (control negativo) e incubada con el suero anti-LIC20040. Luego, se incubó con anti-mouse-HRP, se reveló por método colorimétrico (OPD) y la absorbancia se midió a 492 nm. Las barras representan el promedio \pm SEM. *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

2.3.6. Expresión in vivo del gen lic20040

Se evaluó la presencia de LIC20040 durante la infección con LIC por Western blot. Para ello, se analizaron las proteínas totales de los riñones de ratones C3H/HeJ infectados con LIC experimentalmente luego de 14 días de infección, y de ratones no infectados que se usaron como controles. Estas muestras se sembraron en un SDS-PAGE 10%, se transfirieron a una membrana de PVDF y se expusieron a un anticuerpo que reacciona contra β -actina para corroborar que la cantidad de proteínas de cada muestra era similar (**Figura 2.10**). Luego de

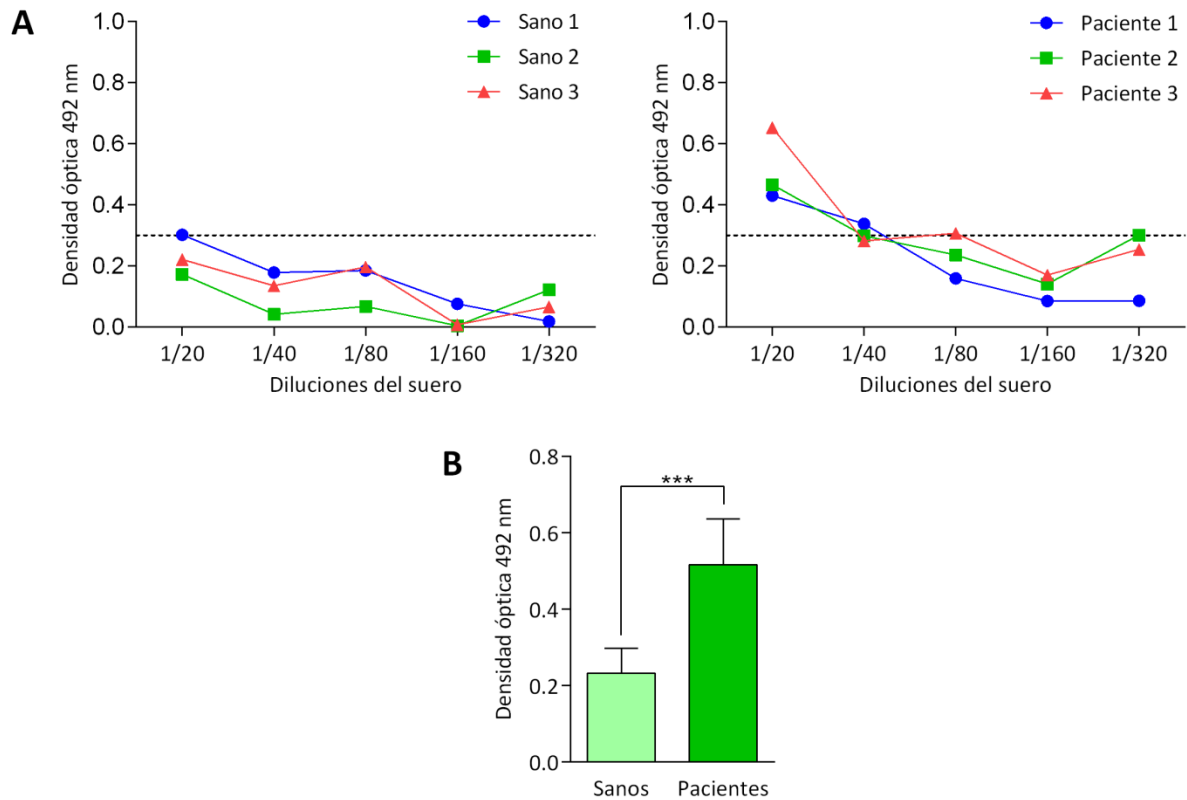
un tratamiento de *stripping* para despegar este anticuerpo, la membrana se incubó con el suero policlonal anti-rLIC20040. La propia proteína recombinante se utilizó como control positivo.

Se observó la presencia de una banda de proteína de mayor peso molecular que LIC20040 (34,4 kDa) en los riñones infectados. Este peso molecular tampoco se corresponde al de la proteína con la secuencia del péptido señal (36,4 kDa). Esto sugiere que LIC20040 sufriría modificaciones postraduccionales y/o que formaría un heterodímero con otra proteína cuando se expresa *in vivo*. Esta interacción sería muy estable ya que resiste la acción del agente reductor presente en el *buffer* de siembra de las muestras (β -mercaptoetanol) y la desnaturalización por calor.



2.3.7. Análisis de antigenicidad de LIC20040

Mediante un ensayo de ELISA se evaluó la presencia de anticuerpos IgG contra rLIC20040 en sueros de tres pacientes convalecientes de Leptospirosis, previamente confirmados por MAT, y en sueros de tres donantes sanos (controles) (**Figura 2.11A**). Aunque rLIC20040 fue reconocida por sueros de pacientes convalecientes, los niveles fueron relativamente bajos ($P < 0,001$; **Figura 2.11B**).



2.3.8. Localización celular de LIC20040

Para este ensayo, se fijaron leptospiras viables (LIC) en paraformaldehído (PFA) 4% o se hirvieron para desintegrarlas. Estas suspensiones de bacterias se utilizaron en un ensayo de ELISA, donde se incubaron con el suero policlonal anti-rLIC20040. Aunque se observó mayor reactividad en las leptospiras hervidas ($P < 0,001$), también se observó reactividad en las leptospiras fijadas con PFA (**Figura 2.12**). Teniendo en cuenta la hipótesis sobre la localización de LIC20040 en *L. interrogans* serovar Copenhageni (**Figura 2.4**), este ensayo sugiere que la proteína se ubicaría en el citosol de LIC, aunque serían necesarios más estudios para determinar si está anclada a la membrana interna de la bacteria o no.

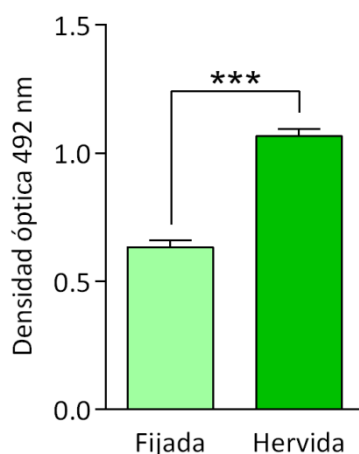


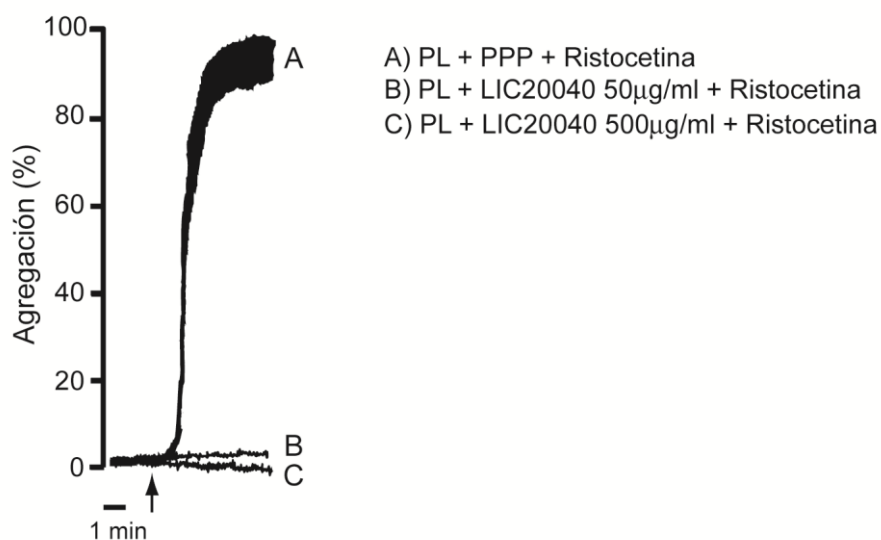
Figura 2.12. Reactividad del suero policlonal anti-rLIC20040. El ensayo se realizó sobre una placa sensibilizada con LIC fijada en paraformaldehído (entera), LIC hervida (desnaturalizada). Se reveló por método colorimétrico (OPD) y la absorbancia fue medida a 492 nm. Las barras representan el promedio \pm SEM. *** $P < 0,001$.

2.3.9. Ensayo de agregación plaquetaria

Como se mencionó anteriormente, la proteína LIC20040 posee un dominio von Willebrand tipo A (vWA) en su secuencia que podría tener efecto sobre la hemostasia, ya que este dominio podría reconocer el receptor para el vWF sobre la superficie plaquetaria, la glicoproteína GPIb, que forma complejo con las GPIX-V. La interacción del vWF con la GPIb induce la aglutinación de las plaquetas. Teniendo en cuenta que en condiciones fisiológicas el vWF es esencial para la adhesión de las plaquetas frente a una lesión endotelial, y también participa en la agregación plaquetaria, se propuso caracterizar la actividad biológica de la proteína rLIC20040, con su dominio vWA, realizando un ensayo de agregación de plaquetas humanas inducido por ristocetina. El *ensayo de actividad de cofactor de ristocetina* (vWF:RCo) es el método de elección para medir la actividad del vWF, ya que representa su expresión funcional. El antibiótico ristocetina induce un cambio en la densidad de cargas de la membrana plaquetaria y en la conformación del vWF, facilitando así la interacción entre el vWF y la GPIb.

Para la caracterización, se incubaron plaquetas humanas lavadas (libres de plasma y resuspendidas en *buffer* Tyrode) con 100 μ l de plasma pobre en plaquetas (PPP) como fuente de vWF, o con la proteína recombinante en dos concentraciones diferentes: 1) la misma

concentración empleada para la obtención de anticuerpos anti-rLIC20040 que resultó eficiente para activar la respuesta inmune en los ratones BALB/c (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o 10 μg totales) y 2) una concentración diez veces superior (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o 100 μg totales). Luego, las plaquetas se estimularon con la adición de ristocetina (1 mg/ml). La agregación plaquetaria se midió en un agregómetro como la disminución de la densidad óptica (DO) en función del tiempo, es decir, a menor DO, mayor porcentaje de agregación. Los resultados obtenidos demuestran que mientras la presencia de PPP permitió una respuesta máxima de agregación plaquetaria, ninguna de las concentraciones de la proteína LIC20040 recombinante que se ensayaron fue capaz de activar a las plaquetas (**Figura 2.13**).



2.4. Discusión

Cuando comenzamos este trabajo de Tesis nos enfocamos en la caracterización de las proteínas BatA (LIC20040) y BatB (LIC20041), ya que ambas poseen homólogos predichos de dominios von Willebrand tipo A (**Figura 2.2**), un dominio ampliamente caracterizado. Ambas proteínas poseen un péptido señal en su extremo N-terminal, pero sólo BatB contiene hélices transmembrana. Es probable que BatB se encuentre atravesando la membrana

interna de la bacteria, estando en contacto tanto con el periplasma como con el citoplasma (**Figura 2.3**), y que interactúe con BatA que se encuentra en el citosol, un hecho que obtuvo soporte parcial en nuestro ensayo de localización celular (**Figura 2.10**). Ambos genes fueron amplificados en los genomas de las siete especies patógenas evaluadas en este trabajo, a saber, *L. interrogans* serovar Copenhageni (L1-130), Canicola (Hond Utrecht IV), Grippotyphosa (Moskva V), Icterohaemorrhagiae (RGA) y Pomona (Pomona); *L. borgpetersenii* serovar Ballum (Castellonis Castellon 3) y Tarassovi (Perepelicin); y también en la especie saprófita *L. biflexa* serovar Patoc (Patoc I) (**Figura 2.4A**). No obstante, los transcritos de *lic20040* no fueron detectados en *L. interrogans* serovar Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae y Pomona bajo las condiciones óptimas de cultivo *in vitro* ensayadas (**Figura 2.4B**).

Debido a que sólo fue posible obtener LIC20040 recombinante (**Figura 2.5-2.6**) y antisuero contra ella (**Figura 2.7**), el resto de los ensayos biológicos se centraron en esta proteína. En ratones C3H/HeJ infectados con *L. interrogans* serovar Copenhageni (LIC), el producto de este gen sufriría modificaciones postraduccionales y/o formaría heterodímeros estables (**Figura 2.8**), lo cual explicaría las dificultades encontradas durante su purificación. Por otro lado, la proteína fue reconocida por sueros de pacientes convalecientes de Leptospirosis (**Figura 2.9**), es decir, la proteína también se expresa durante la infección en humanos. En cuanto a la caracterización de la función biológica de LIC20040, se demostró *in vitro* que la proteína recombinante no afecta la agregación plaquetaria en presencia de ristocetina (**Figura 2.12**).

Por otro lado, durante el transcurso de este trabajo, Stewart y colegas publicaron un estudio de la funcionalidad de las proteínas Bat en mutantes generados en *L. biflexa*, evaluando la velocidad de crecimiento, la morfología y la contribución de estas proteínas a la protección contra el estrés oxidativo en estas bacterias [101]. En *L. biflexa*, se encontraron sólo 3 homólogos de los genes *bat*: *batA*, *batB* (gen que está fusionado a *batC*) y *batD*. Todos poseen hélices transmembrana, pero sólo *batD* tiene una secuencia en su extremo N-terminal que serviría de péptido señal. Además, *batB* contiene un motivo TPR de interacción proteína-proteína, es decir, las proteínas Bat también formarían un complejo en la membrana interna/externa al igual que en las especies patógenas de *Leptospira* y en *B. fragilis*. Los mutantes fueron generados por reemplazo alélico utilizando un transposón, el cual eliminó sólo el gen *batA* o los tres genes *bat-ABD*. El análisis transcripcional demostró la exis-

tencia de promotores individuales para cada uno de los genes, aunque los genes se encuentran dispuestos en tándem. Sin embargo, la ausencia de proteínas Bat no causó cambios morfológicos o diferencias ultraestructurales entre los mutantes y la cepa parental, según se observó por microscopía electrónica de barrido y transmisión. Asimismo, la velocidad de crecimiento de todas las cepas en cultivo líquido *in vitro*, aireado o estático, fue similar; así como también la morfología y la velocidad de formación de colonias en medio EMJH sólido. Pero el dato más importante es que tanto los mutantes como la cepa parental mostraron la misma sensibilidad frente al estrés oxidativo (peróxido de hidrógeno, superóxido), indicando que las proteínas Bat no estarían implicadas en la protección directa contra las especies reactivas del oxígeno, ni tampoco actuarían censando la presencia de estas moléculas para inducir una respuesta protectora en *L. biflexa*.

L. biflexa carece de homólogos de proteínas para la detoxificación de especies reactivas del oxígeno y reparación de proteínas dañadas, pero sí posee dos enzimas que están muy conservadas entre las bacterias aerobias, implicadas en la reducción de las moléculas reactivas del oxígeno: la superóxido dismutasa y la hidroperoxidasa I. No obstante, no son suficientes para proteger a la bacteria, ya que *L. biflexa*, y también *L. interrogans*, son muy susceptibles al daño oxidativo. En conclusión, la función de las proteínas Bat en espiroquetas es aún desconocida.

El trabajo publicado por Stewart y colegas, sumado a la ausencia de acción biológica de rLIC20040 en plaquetas y a la imposibilidad de expresar LIC20041 recombinante, hicieron que desistiéramos en continuar trabajando en este tema. Por lo tanto, nos centramos en el estudio de la función de los neutrófilos durante la infección murina con *Leptospira*, como se detalla en el Capítulo III, y en el análisis de la relación entre el polimorfismo del TLR2 y la Leptospirosis, como se describe en el Capítulo IV.

CAPÍTULO III

ROL DE LOS NEUTRÓFILOS EN LA LEPTOSPIROSIS

CAPÍTULO III: ROL DE LOS NEUTRÓFILOS EN LA LEPTOSPIROSIS

3.1. Introducción

Los neutrófilos son leucocitos derivados de la médula ósea que tienen una vida corta en la circulación sanguínea. Poseen dos características morfológicas distintivas: un núcleo dividido en lóbulos y una gran cantidad de gránulos. Por esta razón, también son conocidos como “células polimorfonucleares” o “granulocitos”. Cuando se produce una infección, los neutrófilos migran hacia los tejidos a través de los vasos sanguíneos, siguiendo un gradiente quimiotáctico producido por señales microbianas y/o endógenas. Una vez en el sitio inflamatorio, los neutrófilos son activados para producir citoquinas, degranularse (liberando enzimas líticas, péptidos catiónicos y compuestos reactivos del oxígeno) y para fagocitar a los patógenos [102, 103]. Durante mucho tiempo han sido considerados como células efectoras con una actividad biosintética limitada y cuya participación principal era la resistencia frente a patógenos extracelulares y en la inflamación aguda. Sin embargo, en años más recientes se ha demostrado que los neutrófilos poseen funciones más complejas, como la liberación de cromatina para atrapar y/o matar patógenos extracelulares, un proceso conocido como NETosis (del inglés, *Neutrophil Extracellular Traps*) [50], cuyo impacto deriva de la combinación entre la actividad antimicrobiana de los componentes granulares, las histonas y algunas proteínas citosólicas. Por otro lado, los neutrófilos pueden ser inducidos a expresar genes que codifican mediadores claves de la inflamación, como componentes del complemento, receptores Fc (para reconocimiento de anticuerpos), quimioquinas y citoquinas que no sólo tienen efecto sobre la respuesta inmune innata, sino también sobre la respuesta inmune adaptativa [104].

Los neutrófilos detectan patógenos extracelulares gracias a que expresan una gran variedad de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), incluyendo toda la familia de TLRs, con excepción de TLR3 [105]. Estos receptores reconocen patrones específicos en la superficie de los patógenos y, en conjunto con señales derivadas de los linfocitos, activan la función efectora de los neutrófilos. Los neutrófilos también contribuyen con la respuesta humoral, ya que almacenan moléculas solubles de reconocimiento de patrones (PRMs) que

se liberan al medio y actúan de manera similar a los anticuerpos, opsonizando microorganismos y promoviendo la fagocitosis y la activación de la cascada de complemento [106-108].

La función de los neutrófilos en la resistencia a patógenos extracelulares es ampliada por la respuesta inmune T helper 17 (Th17). La interleuquina (IL)-17, y otras citoquinas secretadas por las células Th17 (IL-8, interferón γ , TNF y GM-CSF), promueven la granulopoyesis y la consiguiente proliferación y acumulación de neutrófilos [109]. Además, estas citoquinas favorecen el reclutamiento, la activación y la supervivencia de los neutrófilos en los sitios de inflamación [110]. Una vez que los neutrófilos han sido reclutados a los tejidos inflamados, se generan interacciones bidireccionales con macrófagos, células dendríticas y células *natural killer* (NK), linfocitos y células madre mesenquimales que culminan con la eliminación de los patógenos.

En relación a la Leptospirosis, todavía se desconoce el rol de los neutrófilos en la patogénesis de esta enfermedad. La falta de animales *knock-out* en neutrófilos ha requerido el uso de agentes farmacológicos o estrategias de depleción mediadas por anticuerpos para estudiar el rol de estas células (y de otras células efectoras) en modelos animales de Leptospirosis. Algunas de las drogas empleadas para la depleción de los neutrófilos, como ciclofosfamida o vinblastina, son supresoras de la mielopoyesis y, por lo tanto, no sólo eliminan a los neutrófilos sino también a otras células derivadas de la médula ósea, por lo que pueden dificultar la interpretación de los resultados [111, 112].

La proteína Ly-6G, también conocida como Gr-1 (antígeno 1 de diferenciación de granulocitos), se expresa en la superficie de las células mieloides de la médula ósea de manera regulada. Los monocitos sólo expresan este antígeno transitoriamente durante su desarrollo, pero los granulocitos de médula ósea y los neutrófilos periféricos lo expresan siempre, por lo cual resulta un buen marcador para estas células. El anticuerpo monoclonal RB6.8C5 [113], que reconoce el antígeno Gr-1, ha sido ampliamente utilizado para depletar neutrófilos en diferentes modelos murinos y así evaluar su efecto en la infección por varios patógenos, como *Borrelia Burgdorferi* o *Bordetella Pertussis* [114, 115], o para estudiar procesos inflamatorios [116]. Sin embargo, los resultados obtenidos con RB6.8C5 no son concluyentes. Por un lado, se ha publicado que este anticuerpo se une con menor afinidad a las

células murinas derivadas de la médula ósea que expresan la proteína homóloga Ly-6C, pero por otro lado, estudios posteriores no demostraron una unión significativa a subpoblaciones celulares que expresan niveles moderados a altos de Ly-6C, como los monocitos, macrófagos, linfocitos T CD8⁺, células NK y células dendríticas [113, 117, 118]. En contraste, el anticuerpo monoclonal 1A8, que utilizamos en este trabajo, se une específicamente a Ly-6G y, por lo tanto, depleta selectivamente a los neutrófilos que expresan niveles altos de esta proteína, sin afectar al resto de células Gr-1⁺. De esta manera, resulta una buena herramienta para el estudio de los efectos de la neutropenia durante la infección murina experimental con *Leptospira interrogans*.

3.2. Objetivos específicos

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la depleción de neutrófilos sobre la carga bacteriana en sangre, riñón, pulmón e hígado, el eventual daño histológico renal, la producción de anticuerpos específicos (respuesta humoral) y la producción de citoquinas características de la respuesta inmune tipo Th1, Th2 y Th17, utilizando un modelo de Leptospirosis murina experimental.

3.3. Diseño experimental

Se emplearon 4 grupos de ratones C57BL/6J de 3-4 semanas de edad: dos grupos de 5 animales fueron infectados y dos grupos de 3 animales se utilizaron como controles. El **grupo depletado e infectado (1A8 + LIC)** fue inoculado con 0,5 mg del anticuerpo monoclonal 1A8 por vía intraperitoneal, el día anterior a la infección con LIC (10⁷ bacterias viables). La depleción se mantuvo administrando media dosis de anticuerpo cada 48 horas. Al **grupo depletado no infectado (1A8)** se le administró 1A8 de la misma manera. El **grupo control infectado (IgG rata + LIC)** recibió 0,5 mg de IgG total de rata y la misma dosis de LIC que el grupo depletado. Por último, al **grupo control no infectado (IgG rata)** sólo se le administró IgG total de rata. Todos los animales se pesaron y monitorearon para registrar signos clínicos de Leptospirosis.

Catorce días después de la infección (14 d.p.i.), los animales fueron sacrificados y se colectó la sangre, los riñones y el bazo para los estudios posteriores. La sangre se utilizó para medir los niveles de inmunoglobulinas específicas IgM e IgG (y las subclases IgG1a e IgG2), mientras que los bazos se emplearon para producir cultivos celulares de esplenocitos que fueron estimulados con LIC y luego analizados a nivel transcripcional (expresión de mRNA de citoquinas). Los riñones se utilizaron para el análisis de carga bacteriana, y para el examen histológico y la detección del antígeno LipL32 de LIC. Además, se realizó un experimento similar, pero colectando la sangre y los tejidos a 1 d.p.i, para el estudio de la carga bacteriana y el análisis histopatológico. Ambos experimentos se realizaron por duplicado.

3.4. Resultados

3.4.1. Eficiencia de la depleción de neutrófilos

Para cuantificar la depleción de los neutrófilos, se inyectaron ratones C57BL/6J con 0,5 mg del anticuerpo 1A8 por vía intraperitoneal, y se tomaron muestras de sangre antes de la inoculación y 24 horas después para realizar un análisis hematológico. Los resultados mostraron que hubo un 93% de depleción de granulocitos respecto del control ($P < 0,05$; **Figura 3.1**). El total de granulocitos incluye, además de los neutrófilos, un porcentaje mucho

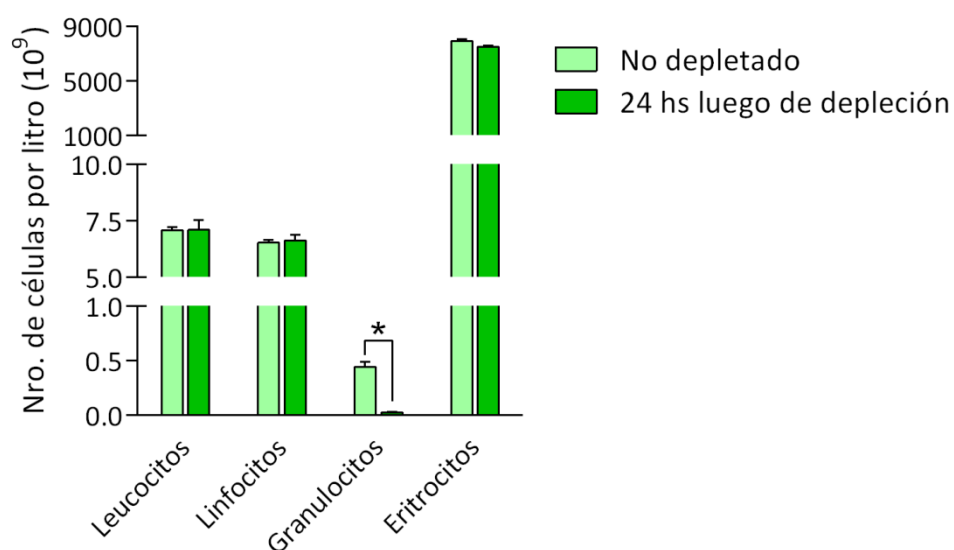


Figura 3.1. Hemograma de sangre entera. Se cuantificaron las células sanguíneas en muestras de sangre extraídas de ratones C57BL/6J tratados o no con el anticuerpo 1A8, mediante un contador hematológico veterinario. Las barras representan el promedio \pm SEM. * $P < 0.05$.

menor de eosinófilos (es raro observar basófilos en los ratones adultos), por lo cual se considera que el grupo celular se compone sólo de neutrófilos. Por otro lado, la depleción se confirmó cada 48 horas tomando muestras de sangre y realizando recuentos diferenciales de leucocitos en un microscopio de campo claro. Estos resultados demuestran que la administración de 0,5 mg de 1A8 fue suficiente para causar neutropenia en los ratones, y que la depleción pudo mantenerse en el tiempo cuando el anticuerpo se inoculó periódicamente.

3.4.2. Curso clínico

Todos los animales, tanto los infectados con LIC como los controles, se pesaron diariamente y monitorearon para registrar cualquier signo que pudiera relacionarse con la Leptospirosis, incluyendo inactividad, pelaje rizado y amontonamiento (signos de estrés/malestar en el animal). El segundo día después de la infección, se registró una reducción del 7,5% del peso original promedio en el grupo control infectado (IgG rata + LIC), y del 10% en el grupo depletado e infectado (1A8 + LIC). Hacia el final del experimento, mientras que los ratones controles habían aumentado su peso original en un 27%, los animales infectados sólo recuperaron un 7% aproximadamente de su peso (**Figura 3.2**). Durante el transcurso del experimento, no se observaron signos clínicos de enfermedad ni muertes espontáneas.

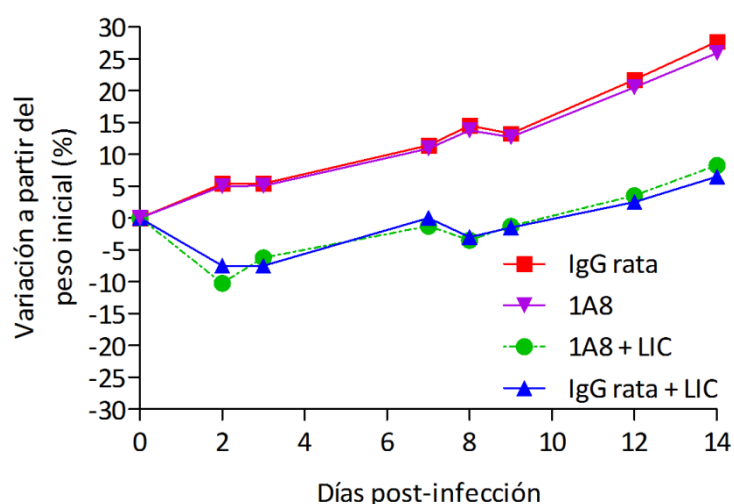


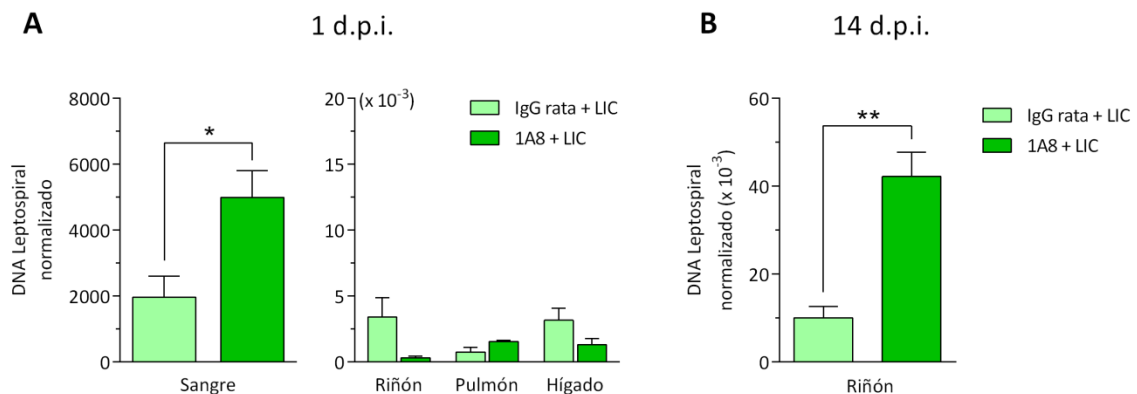
Figura 3.2. Variación porcentual del peso de los ratones C57BL/6J. El peso de los animales fue monitoreado durante el transcurso del experimento hasta su sacrificio a los 14 días post-infección. Las curvas representan el cambio porcentual promedio a partir del peso inicial de cada grupo.

3.4.3. Cuantificación de la carga bacteriana

El efecto de la neutropenia sobre la carga Leptospiral en los animales infectados se cuantificó amplificando el gen *rRNA 16s* (DNA 16s) característico de *Leptospira* por PCR en tiempo real, a partir del DNA total extraído de los tejidos colectados al finalizar el experimento. Las muestras se normalizaron por volumen de sangre o por copias de β -actina (tejidos).

El día posterior a la infección (1 d.p.i.), el grupo depletado e infectado presentó mayor bacteremia que el grupo control infectado, con valores promedio de $\sim 5 \times 10^3$ y $\sim 2 \times 10^3$ copias de DNA Leptospiral/ μ l, respectivamente ($P < 0,05$; **Figura 3.3A**). Sin embargo, no se observaron diferencias en los riñones, pulmones e hígado entre ambos grupos. Asimismo, tampoco se observaron lesiones distintivas a nivel histológico en estos tejidos (resultados no mostrados).

Por otro lado, la carga bacteriana en los riñones a 14 d.p.i. fue 3 veces mayor en los animales depletados e infectados que en el grupo control infectado ($P < 0,01$), con valores promedio de $\sim 4 \times 10^{-2}$ y $\sim 1 \times 10^{-2}$ copias de DNA Leptospiral/ β -actina, respectivamente (**Figura 3.3B**). El aumento de la carga bacteriana en los animales depletados se confirmó por inmunohistoquímica, utilizando un suero policlonal de ratón anti-LipL32 que evidenció cerca de un 100% de incremento en el número de túbulos renales positivos respecto del grupo no depletado ($P < 0,05$; **Figura 3.4**).



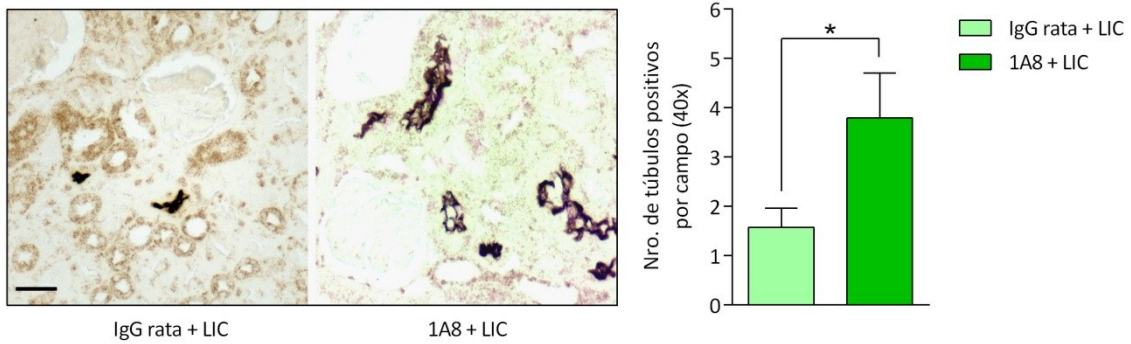


Figura 3.4. Análisis inmunohistoquímico. Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica de LipL32 en riñones colectados 14 días post-infección. Los cortes se contratiñeron con hematoxilina. Escala = 80 μ m. El gráfico de barras representa el número promedio de túbulos renales positivos por campo 40X \pm SEM. * $P < 0,05$.

3.4.4. Análisis histopatológico renal

Para estudiar el efecto de la infección con LIC y/o de la neutropenia sobre el daño renal, un patólogo realizó un examen histológico y calificó el grado de nefritis observado, cuya escala se detalla en la sección 6.18 (Capítulo VI). El grupo control no infectado (1A8) no

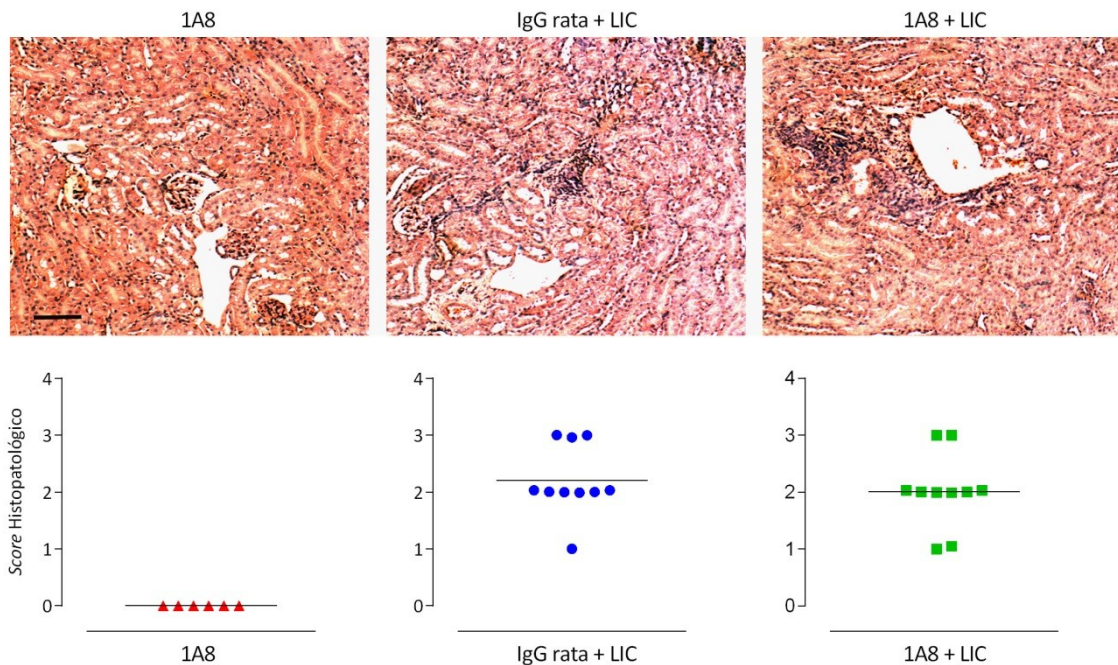


Figura 3.5. Histopatología renal. Histología de cortes representativos de riñones colectados 14 días post-infección que fueron teñidos con hematoxilina/eosina, y score de inflamación. El grupo 1A8 muestra una apariencia normal, mientras que los grupos IgG rata + LIC y 1A8 + LIC presentan un nefritis leve similar. Escala = 150 μ m.

mostró signos histopatológicos (**Figura 3.5**). Sin embargo, todos los ratones infectados con LIC, tanto depletados como no, mostraron una nefritis moderada de grado 2, con pequeños cúmulos intersticiales y trazas en el área de unión córtico-medular (o núcleo profundo) en relación a los tabiques conectivos vasculares.

3.4.5. Efecto de la neutropenia sobre la respuesta humoral

La expresión de anticuerpos específicos IgM e IgG se evaluó por la técnica de ELISA. Se observó una disminución de aproximadamente 20% en los niveles de IgM anti-LIC en el grupo depletado, en comparación con los ratones no depletados ($P < 0,05$; **Figura 3.6A**). En contraste, los animales depletados mostraron un aumento en los niveles de IgG total respecto de los no depletados, aunque este incremento no fue significativo estadísticamente.

Además, se evaluó la producción de anticuerpos específicos anti-LIC IgG1a e IgG2 de la misma manera, como una caracterización parcial de la polarización de la respuesta inmune T-helper [119]. La depleción de los neutrófilos aumentó los niveles de ambas inmunoglobulinas tanto en los animales infectados, pero sólo se observó una diferencia significativa en

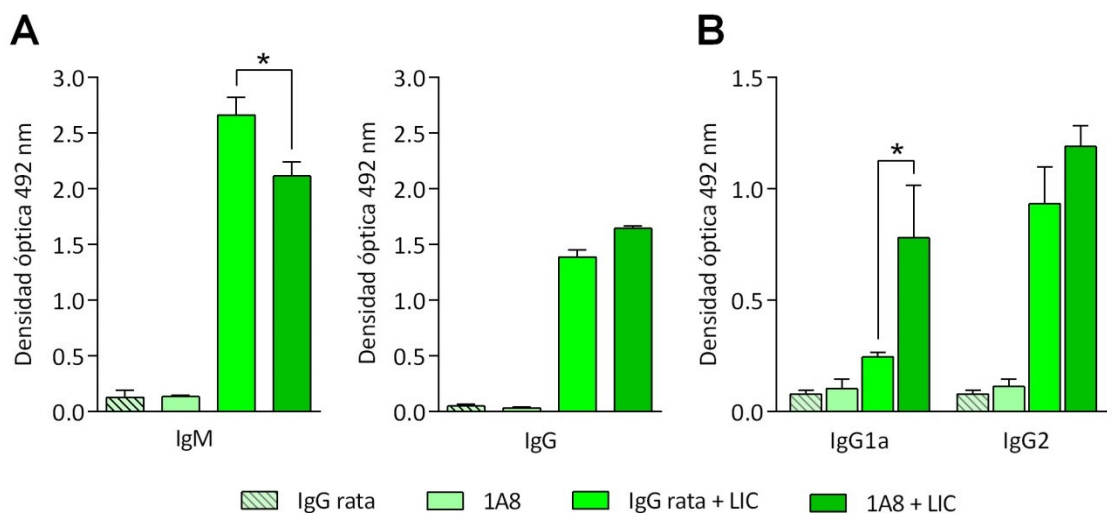
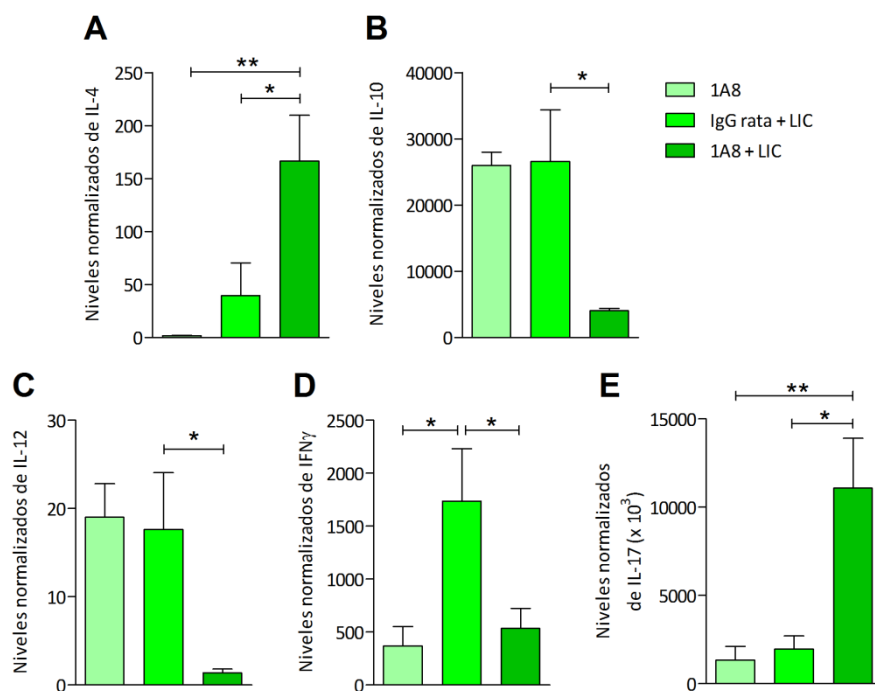


Figura 3.6. Respuesta humoral. Se realizaron ensayos de ELISA en microplacas cubiertas con 10^6 *L. interrogans* serovar Copenhageni (LIC) para detectar **(A)** anticuerpos IgM e IgG anti-LIC y **(B)** subclases de anticuerpos IgG anti-LIC en el suero de los ratones C57BL/6J que se colectaron 14 d.p.i.. Como controles se utilizaron los sueros de los animales no infectados que fueron tratados con IgG de rata o 1A8. Las placas se revelaron por método colorimétrico (OPD). Las barras representan la absorbancia promedio a 492 nm \pm SEM. * $P < 0,05$.

el anticuerpo IgG1a, cuya producción aumentó dos veces respecto del grupo control infectado ($P = 0,0147$; **Figura 3.6B**).

3.4.6. Niveles transcripcionales de citoquinas en cultivos de esplenocitos estimulados con LIC

Los bazo de los animales infectados con LIC que se colectaron al finalizar el experimento se utilizaron para preparar cultivos de esplenocitos, los cuales se estimularon con aproximadamente 3 bacterias por célula, y luego se extrajo el RNA total para analizar el perfil de citoquinas por PCR en tiempo real. Se cuantificaron citoquinas representativas de la respuesta inmune Th1, Th2 y Th17: IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e interferón gamma (IFN γ). Mientras que los niveles transcripcionales de IL-4 ($P < 0,05$; **Figura 3.7A**) e IL-17 ($P < 0,05$; **Figura 3.7E**) se incrementaron en los animales depletados e infectados respecto del grupo control infectado, los niveles de IL-10, IL-12 e IFN γ se redujeron ($P < 0,05$; **Figura 3.7B-D**).



3.5. Discusión

Descifrar el papel de los neutrófilos en la respuesta inmune a la infección es un proceso complejo. Sin animales modificados genéticamente que carezcan de neutrófilos, el único procedimiento disponible es la depleción *in vivo* con un anticuerpo y, sin las herramientas precisas, generalmente puede producir algunos resultados ambiguos. En nuestro estudio, el anticuerpo monoclonal 1A8, que se une exclusivamente a los neutrófilos Ly6G^{high} [118], depletó eficientemente a los neutrófilos, como se detectó 24 horas después de la administración (**Figura 3.1**). Independientemente de la depleción, los pesos registrados de los ratones infectados y de los controles siguieron el mismo patrón durante el transcurso del experimento (**Figura 3.2**).

En la etapa temprana de la infección (1 d.p.i.), los ratones depletados de neutrófilos presentaron mayor bacteremia, pero no así un aumento de la carga bacteriana en otros tejidos comúnmente colonizados por *Leptospira interrogans* (**Figura 3.3A**), los cuales tampoco mostraron anomalías histopatológicas (datos no mostrados).

Por otro lado, la carga bacteriana renal a 14 d.p.i. fue tres veces mayor en los animales tratados con 1A8 en comparación con el grupo control infectado (**Figura 3.3B**), un hecho adicionalmente confirmado por el incremento de túbulos renales positivos para anti-LipL32 observado por inmunohistoquímica (**Figura 3.4**). Se han reportado estudios de depleción donde tanto los ratones depletados y no depletados de neutrófilos presentaron recuentos de UFC similares al ser infectados con la bacteria Gram-negativa *Bordetella pertussis* o la levadura *Histoplasma capsulatum* [114, 120]. Por el contrario, otras publicaciones reportaron que los ratones depletados de neutrófilos presentaron mayor bacteremia con *Enterococcus faecium* o mayor carga bacteriana de *Listeria monocytogenes* en bazo en comparación con los animales no depletados [121, 122]. En conjunto, estos resultados sugieren que el desenlace de la infección luego de la depleción de neutrófilos depende de la naturaleza del agente infeccioso y, en el caso de *Leptospira interrogans*, nuestros resultados indican que los neutrófilos son importantes al menos para el control de la carga bacteriana en la sangre y los riñones durante la fase aguda.

Una explicación parcial de cómo la depleción de neutrófilos podría inducir el aumento de la carga leptospiral renal podría basarse en los trabajos previamente publicados por

Wang y colegas, quienes reportaron que el patógeno *L. interrogans* serovar Icterohemorrhagiae se adhiere a la superficie de los neutrófilos humanos pero que estas células no siempre lo fagocitan, incluso en presencia de 10% de suero normal. Sin embargo, en presencia de anticuerpos específicos, los neutrófilos son capaces de fagocitar y matar a la mayoría de las bacterias, lo cual llevó a concluir que los neutrófilos no son factores eficientes en la defensa contra las leptospiras patogénicas en los huéspedes no inmunes [45, 46]. Considerando que se han obtenido resultados similares con neutrófilos de rata y cobayo infectados *in vitro* con *L. interrogans* [43, 44], y también en ratones BALB/c infectados con *Bordetella pertussis* [114], se puede deducir que los neutrófilos humanos y murinos tienen un comportamiento similar. En este sentido, alguna variación en los niveles de inmunoglobulinas específicas podría también afectar la fagocitosis directa de los neutrófilos, como la reducción del nivel de IgM que observamos en los animales tratados con 1A8 (**Figura 3.6A**). Es interesante que algunos estudios de infección con *L. interrogans* realizados en ratones *wild-type* y varios transgénicos identificaron a las células B como el subgrupo de linfocitos cruciales para la eliminación de las bacterias del huésped, a través de la producción temprana de anticuerpos IgM específicos contra el LPS [51].

Por otra parte, fue inesperado observar un grado de nefritis similar entre los animales tratados con 1A8 y el grupo no depletado, considerando que en general los neutrófilos contribuyen al daño tisular produciendo intermediarios reactivos del oxígeno y liberando enzimas líticas [123, 124]. Hay varios factores que deben tenerse en cuenta para explicar esto. En primer lugar, la nefritis aguda inducida por LIC en los ratones C57BL/6J fue sólo moderada, y en este sentido resultó difícil percibir pequeñas diferencias entre ambos grupos (**Figura 3.5**). Adicionalmente, las células linfo-monocíticas constituyen la población celular mayoritaria en el exudado inflamatorio, de acuerdo con la fórmula hematológica murina, que posee una preponderancia fuerte de linfocitos (75-90%) versus granulocitos (10-25%) [125]. Finalmente, los ratones infectados y depletados de neutrófilos presentaron mayor carga bacteriana, lo cual podría balancear la ausencia de neutrófilos y su eventual contribución a la nefritis.

Nuestros resultados en cuanto a los niveles de mRNA de citoquinas en los esplenocitos sugieren un perfil Th1 predominante en los ratones infectados no depletados, indicado por los altos niveles de IFN γ e IL-12 (**Figura 3.7C-D**), en correlación con una mayor expresión

de anticuerpos específicos IgG2 que de IgG1a (**Figura 3.6B**) [126, 127]. Esto podría reflejar la respuesta aguda natural propia de los roedores frente a las infecciones leptospirales, aunque también se ha vinculado una respuesta Th1 a una colonización renal reducida en ganado infectado con *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo [128], sugiriendo que sería un fenómeno más generalizado. Por otro lado, los ratones depletados de neutrófilos con el anticuerpo 1A8 parecieron tener un perfil mixto ya que, aunque presentaron menores niveles de IL-10 que los animales no depletados (**Figura 3.7B**), mostraron mayores niveles de IL-4 y menores de IFN γ e IL-12 (**Figura 3.7A, 3.7C-D**). Este giro de la respuesta inmune también se ha reportado en estudios de depleción en la infección con *Candida albicans* [129]. El tratamiento con el anticuerpo monoclonal 1A8 también incrementó la expresión de IL-17 en los esplenocitos (**Figura 3.7E**). Esto podría haber contribuido al aumento de la expresión de IgG2, ya que se ha descrito que la IL-17 conduce a las células B a cambiar la clase de isotipo que producen, preferentemente hacia los subtipos IgG2a e IgG3 [130]. Es interesante notar que las células efectoras Th17 productoras de IL-17 han sido relacionadas directamente con la inflamación renal, ya sea activando neutrófilos o participando en el daño tisular mediado por macrófagos [131]. Sin embargo, todavía no se conocen todas las funciones de las células Th17 en la enfermedad renal, y deben realizarse más estudios para entender su participación.

Los datos presentados en este trabajo proporcionan información sobre el papel desempeñado por los neutrófilos como parte de la respuesta inmune innata en la Leptospirosis murina aguda experimental y su posible implicación en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa contra leptospiras patógenas. Con suerte, los estudios futuros evaluarán más a fondo el papel de otras células efectoras durante la enfermedad y su interacción con los leucocitos polimorfonucleares.

CAPÍTULO IV

RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO DEL TLR2 Y LA LEPTOSPIROSIS

CAPÍTULO IV: RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO DEL TLR2 Y LA LEPTOSPIROSIS

4.1. Introducción

Los receptores tipo Toll (TLRs) son glicoproteínas tipo I que se expresan en la superficie celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR11) o intracelularmente en el retículo endoplasmático y en endosomas (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9). Contienen un ectodominio, el cual está involucrado en el reconocimiento de los ligandos y las interacciones con co-receptores, una región transmembrana y un dominio Toll/IL-1R (TIR) de señalización intracelular [132].

El TLR2 reconoce una gran variedad de patrones moleculares asociados a patógenos, incluyendo bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, micobacterias, hongos, virus, y parásitos, por lo cual juega un papel central en la respuesta inmune innata. Esta flexibilidad de reconocimiento de diferentes ligandos, tales como lipoproteínas y lipopéptidos, peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, LPS, porinas, glicolípidos y hemaglutinina, entre otros, se debe principalmente a la capacidad del receptor de formar heterodímeros con TLR1 o TLR6 [133, 134].

El reconocimiento de los ligandos inicia la dimerización del TLR2 con TLR1 o TLR6, lo cual aproxima sus dominios TIR y desencadena la fosforilación de los residuos tirosina [134]. Esto permite el reclutamiento de las proteínas adaptadoras Myd88 y TIRAP/Mal, que disparan la cascada de señalización dependiente de quinasas, culminando con la activación del factor de transcripción NF- κ B y su traslocación al núcleo de la célula [132]. NF- κ B es un complejo proteico que está presente en la mayoría de las células animales y que tiene un rol clave en la regulación de la respuesta inmune frente a las infecciones bacterianas y virales, ya que potencia la transcripción de las cadenas ligeras kappa de las inmunoglobulinas y la producción de citoquinas pro-inflamatorias [135].

Aunque TLR4 media la señalización que desencadena el LPS de las bacterias Gram-negativas (principalmente enterobacterias), el TLR2 humano detecta los LPS "no clásicos" de especies de *Legionella*, especies de *Bordetella*, *Leptospira* y *Porphyromonas* [136]. El LPS de

Leptospira es inusual porque posee un lípido A con una estructura inusual, ya que tiene un fosfato metilado único que no se encuentra en el lípido A de otras bacterias. Este LPS es reconocido por TLR2/TLR1 en células humanas, pero por TLR2/TLR4 en células murinas, lo cual evidencia las diferencias en cuanto a afinidad y especificidad de ligandos entre especies [42, 133, 137]. La incapacidad del sistema inmune innato humano de detectar el LPS de *Leptospira* a través del TLR4, el receptor de LPS canónico, es un factor clave que contribuye a la susceptibilidad de los humanos a la infección [138]. La atención se centra entonces en el TLR2, y en investigar las razones que determinan que algunos pacientes sean más susceptibles a la infección por *Leptospira* que otros.

La expresión incrementada de TLR2 en los seres humanos está restringida principalmente a tipos celulares implicados en la defensa aguda del huésped, como las células hematópoyéticas derivadas de médula ósea, incluyendo monocitos, macrófagos, granulocitos y células dendríticas, seguido de las poblaciones de células provenientes del bazo y el pulmón [5]. Por ejemplo, en los neutrófilos, TLR2 se expresa en concentraciones más altas que TLR4 [139]. El TLR2 también se expresa en las células B y T que participan en la inmunidad adaptativa y en una variedad de otras células, incluyendo las células endoteliales vasculares e intestinales, adipocitos y miocitos cardíacos [8, 140].

El gen *tlr2* humano está localizado en el cromosoma 4q32 y se compone de 3 exones. Los dos primeros exones son no codificantes (no se traducen), mientras que el marco de lectura abierto completo se encuentra en el exón 3 [141]. Existen variaciones de la secuencia de DNA, denominados “polimorfismos de un único nucleótido” o SNPs (del inglés, *single nucleotide polymorphisms*), que se producen cuando un único nucleótido en la secuencia del genoma se altera. En el gen *tlr2* se han reportado 89 polimorfismos de un único nucleótido, aunque sólo 17 SNPs se encuentran en el tercer exón y resultan relevantes [5, 142, 143] (Figura 4.1).

Muchos SNPs no tienen ningún efecto sobre la función de las células, ya sea porque no resultan en cambios de aminoácidos (SNPs sinónimos), o debido a que el cambio de aminoácido no afecta la estructura de la proteína o sus características (SNPs no sinónimos). De los 17 SNPs del exón 3 descritos hasta la fecha, sólo tres polimorfismos en el dominio extracelular del receptor y seis en el dominio intracelular son no sinónimos, y dos de ellos han

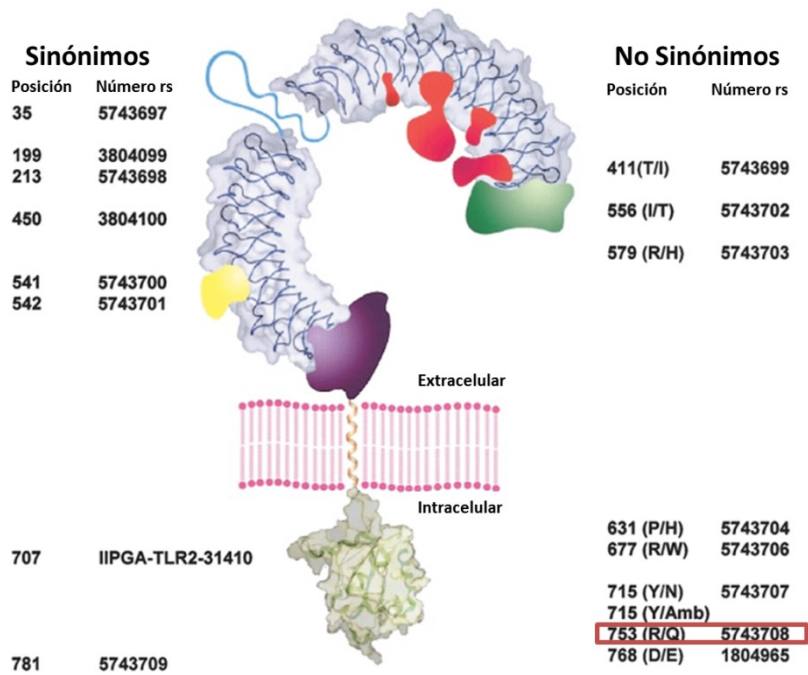


Figura 4.1. Polimorfismos reportados en el exón 3 del receptor tipo Toll 2 (TLR2). El receptor posee un dominio extracelular para el reconocimiento de ligandos, un dominio transmembrana y un dominio intracelular responsable de la activación de la cascada de señalización. Se han reportado 17 SNPs en el exón 3 del gen *tlr2*: 8 sinónimos (6 extracelulares + 2 intracelulares) y 9 no sinónimos (3 extracelulares + 6 intracelulares). Se encuentra recuadrado el SNP R753Q (Arg753Gln). Posición: número de aminoácido en la secuencia del TLR2, seguido por el cambio de aminoácido entre paréntesis. rs: referencia SNP (en bases de datos). *Imagen adaptada de Texereau 2005 [5].*

sido relacionados con la reducción de la activación del factor transcripcional NF- κ B, y con un aumento del riesgo de infección [144, 145].

Una mejor comprensión del proceso de una enfermedad infecciosa se puede lograr mediante el estudio de la respuesta inmune y la composición genética de las personas susceptibles y resistentes. Por ejemplo, se ha demostrado que las variantes alélicas humanas de los genes implicados en la respuesta inmune innata pueden influir en la susceptibilidad a la infección y/o en la progresión hacia la sepsis grave y el shock séptico [146]. Uno de los polimorfismos mejor caracterizados que reducen la activación NF- κ B es el que estudiamos en este trabajo. Se trata de una sustitución de una guanina por una adenina (G \rightarrow A) en el nucleótido 2258 a partir del codón de inicio del gen *tlr2*, que reemplaza una arginina por una glutamina en la posición 753 (Arg753Gln).

4.2. Objetivos específicos

El objetivo de este trabajo fue analizar la presencia del polimorfismo Arg753Gln en muestras de pacientes convalecientes de Leptospirosis y en dadores sanos, con el propósito de establecer su eventual relación con la susceptibilidad a la enfermedad. Para ello, colaboramos con la Dra. Bibiana Vanasco y Yosena Chiani (INER, Santa Fe).

4.3. Diseño experimental

Con el fin de determinar si el SNP Arg753Gln del TLR2 se encuentra involucrado en el aumento de la susceptibilidad a la Leptospirosis, se analizaron muestras de pacientes convalecientes (previamente confirmados por MAT o PCR) o sospechados de infección, así como también muestras de dadores sanos, mediante la técnica de “*Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción*” o RFLP (del inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphisms*). Para ello, se amplificó un fragmento del gen *tlr2* mediante PCR con oligonucleótidos específicos, que a continuación fue digerido con la enzima de restricción MspI. Finalmente, las digestiones se sembraron en geles de poliacrilamida 10% nativos (sin SDS) para el análisis de los patrones de secuencia.

4.4. Resultados

4.4.1. Amplificación del gen *tlr2*

El RFLP se utiliza como marcador para identificar grupos de personas que presentan riesgo a contraer ciertas enfermedades. Básicamente, la técnica consiste en el análisis de los patrones de digestión de determinados fragmentos de DNA con enzimas de restricción específicas. Debido a que generalmente las secuencias de restricción del DNA poseen distintos patrones de distancia, longitud y disposición en diferentes individuos de una población, se dice que la población es polimórfica para estos fragmentos de restricción.

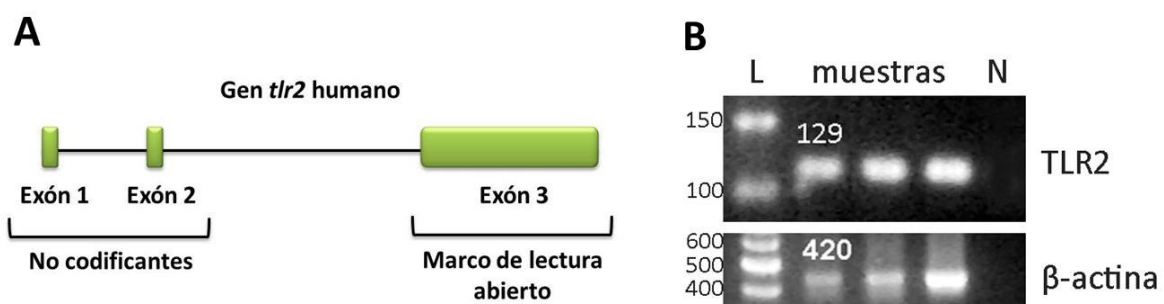
Para realizar el RFLP, se diseñaron oligonucleótidos específicos (**Tabla 6.3**, Capítulo VI) para amplificar un fragmento de 129 pb del exón 3 del gen *tlr2*, dentro del cual se espe-

raba encontrar la variante genética (o alelo) Arg753Gln (**Figura 4.2**). Los alelos son formas variantes de un gen que se encuentran en la misma posición, o *locus* genético, en un cromosoma.

Las amplificaciones del gen *tlr2* de los pacientes convalecientes o sospechados de Leptospirosis fueron provistas por la Dra. Bibiana Vanasco y Yosena Chiani del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER, Santa Fe). El criterio de clasificación de las muestras se basó en las regulaciones del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica por Laboratorios de Argentina (SIVILA), el cual establece:

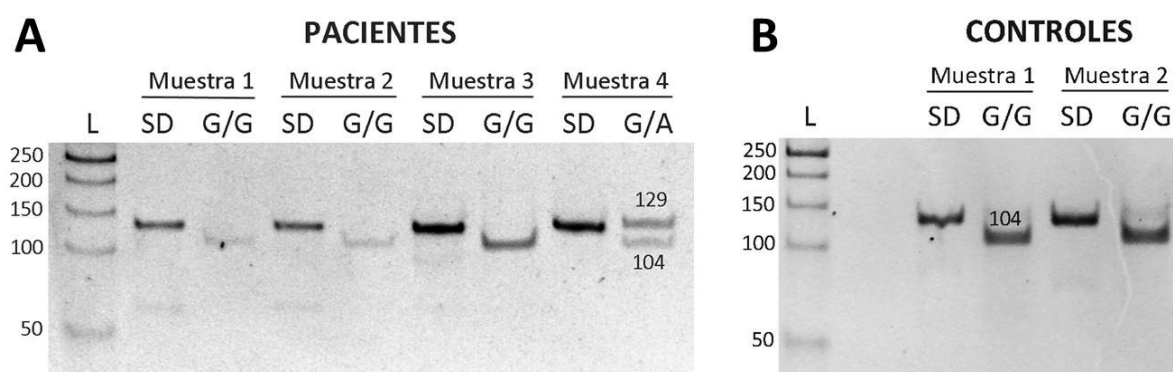
- ✓ *Caso confirmado*: positivo a MAT o PCR en tiempo real (LipL32 o RNA 16s)
- ✓ *Caso sospechoso*: MAT y PCR en tiempo real negativos en muestras con menos de 10 días de evolución
- ✓ *Caso descartado*: MAT y PCR en tiempo real negativos en muestras con más de 11 días de evolución

Por otro lado, se realizó la extracción de DNA a partir de muestras de sangre de donadores sanos mediante un protocolo modificado para maximizar la lisis de los glóbulos rojos, los cuales pueden interferir con la PCR (ver sección 6.6, Capítulo VI). Posteriormente, se realizó la amplificación del fragmento del TLR2 con los oligonucleótidos mencionados anteriormente.



4.4.2. Digestión de fragmentos de DNA

A continuación, los fragmentos amplificados fueron digeridos con la enzima de restricción MspI, la cual reconoce la secuencia 5' CCGG 3' y cliva el DNA después de la primera citosina. El polimorfismo Arg753Gln cambia el codón CGG (arginina) por CAG (glutamina), por lo cual el alelo dominante de *tlr2* es G, mientras que el alelo recesivo es A. En ausencia del polimorfismo, MspI cliva el DNA obteniéndose como resultado dos fragmentos de 104 y 25 pb, pero cuando el polimorfismo está presente, pueden observarse tres bandas (129 + 104 + 25 pb) o una única banda (129 pb) según la muestra provenga de un individuo heterocigota u homocigota para este *locus*, respectivamente. Es importante notar que el fragmento de 25 pb no siempre es visible en el gel debido a su pequeño tamaño. En la **Figura 4.3** se observa el patrón de digestión obtenido para muestras de PCR representativas.



4.4.3. Genotipificación y frecuencias alélicas

A partir del análisis de los patrones de digestión, se asignó la *genotipificación* a cada muestra, es decir, la determinación de cada genotipo. Se analizaron 60 muestras de pacientes, 31 casos confirmados y 29 casos sospechosos, y 15 muestras de dadores sanos: 9,7% de los casos confirmados y 13,8% de los sospechosos resultaron heterocigotas G/A, y 6,5% de los confirmados eran homocigotas recesivos A/A. Por otro lado, el resto de las muestras de pacientes y todos los controles resultaron homocigotas dominantes G/G (**Tabla 4.1**).

Con estos datos se calculó la *frecuencia alélica*, la cual representa la incidencia de un alelo en una población y es un reflejo de la diversidad genética. Además, los cambios en las frecuencias de los alelos a lo largo del tiempo pueden indicar que se está produciendo variación genética o que se han introducido nuevas mutaciones en la población. Para obtener la frecuencia alélica, se debe dividir el número de veces que el alelo de interés se observa en una población por el número total de copias de todos los alelos en ese *locus* genético particular en la población. Por convención, el alelo dominante se denomina *p* y el recesivo, *q* ($p + q = 1,0$).

Se comparó la distribución de los genotipos y las frecuencias alélicas entre las muestras de pacientes y los controles para determinar la susceptibilidad a la infección con *L. interrogans*. La frecuencia alélica de A fue mayor en los pacientes confirmados de Leptospirosis ($q = 0,113$; $P = 0,091$) y en los casos sospechosos ($q = 0,069$; $P = 0,295$) en comparación con los controles ($q = 0$), aunque estos valores no resultaron significativos estadísticamente. Además, las frecuencias genotípicas para este polimorfismo tampoco presentaron variaciones significativas entre los casos confirmados ($P = 0,449$), o los sospechosos ($P = 0,282$), y los controles. Esto probablemente se debe a que la población analizada era pequeña y, en consecuencia, los tres genotipos no se encontraban bien representados (por ejemplo, no se encontraron heterocigotas u homocigotas recesivos entre los controles).

Tabla 4.1. Frecuencias genotípicas y alélicas

	Pacientes (n=60)		Controles (n=15)
	Confirmados n=31 (%) [§]	Sospechosos n=29 (%) [§]	(%) [§]
Arg753Gln			
Alelo Arg (G)	55 (88,7)	54 (93,1)	30 (100)
Alelo Gln (A)	7 (11,3)	4 (6,9)	0
<i>p</i> [*]	0,091	0,295	
Genotipo			
Arg/Arg (G/G)	26 (83,8)	25 (86,2)	15 (100)
Arg/Gln (G/A)	3 (9,7)	4 (13,8)	0
Gln/Gln (A/A)	2 (6,5)	0	0
<i>P</i> [*]	0,449	0,282	

[§]Frecuencia; ^{*} Valor de *P* para el Test Exacto de Fisher

4.5. Discusión

Algunas personas que han sido expuestas a un patógeno desarrollan una enfermedad infecciosa descontrolada, mientras que otras personas logran erradicar o limitar la enfermedad. La secuenciación del genoma humano ha revelado que existen cerca de 14 millones de SNPs en el DNA, de los cuales 200.000 ocurren en secuencias codificantes, demostrando la extensa variabilidad genética y sus posibles efectos sobre la susceptibilidad a las enfermedades y sobre las respuestas individuales a los tratamientos médicos [5].

Los polimorfismos de los TLRs, y del TLR2 particularmente, pueden ayudarnos a entender las respuestas inmunes innatas normales y anormales de un amplio repertorio de patógenos. Por ejemplo, en algunas poblaciones se han reportado asociaciones entre el polimorfismo Arg677Trp del TLR2 y la lepra lepromatosa causada por *Mycobacterium leprae* [147, 148]; o los polimorfismos Arg677Trp y Arg753Gln y la tuberculosis causada por *Mycobacterium tuberculosis* [149, 150]; o el polimorfismo Arg753Gln y la infección por *Staphylococcus aureus* [151]. Se ha observado una activación NF- κ B atenuada y disminución en la liberación de citoquinas en respuesta a la estimulación con *M. tuberculosis* y agonistas del TLR2 en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de pacientes con lepra o tuberculosis que expresaban el polimorfismo Arg753Gln, y en células HEK293 transfectadas con el TLR2 mutante [148, 152, 153]. Además, se han sugerido asociaciones entre ciertos genotipos específicos y el riesgo de contraer sepsis severa, o de obtener resultados clínicos adversos, frente a enfermedades infecciosas tales como neumonía y meningitis [154], así como el aumento de la mortalidad de pacientes con lesiones críticas. En resumen, estos polimorfismos incluyen los que afectan la detección de patógenos (TLR2, TLR4, CD14), las respuestas inflamatorias (TNF α e IL-10) o de la coagulación (PAI-1 y el factor V) [5].

Respecto de los resultados presentados en este trabajo, el número de muestras estudiadas brinda indicios acerca de la relación entre el polimorfismo Arg753Gln del receptor TLR2 y la susceptibilidad a la Leptospirosis en la población Argentina, ya que la variante mutante A representó el 18,2% del total de los alelos de los pacientes convalecientes de Leptospirosis, 11,3% confirmados ($q= 0,113$) y 6,9% sospechosos ($q= 0,069$). No obstante, para validar estos datos estadísticamente se necesitaría analizar un mayor número de muestras que resulten representativas de todos los genotipos posibles. Hasta la fecha, no se ha repor-

tado la frecuencia de este polimorfismo en pacientes con Leptospirosis en otras poblaciones pero, según las bases de datos, la frecuencia promedio del alelo A en la población general es $q= 0,012$ [155].

El patrón de polimorfismos del TLR2 varía entre poblaciones de diferentes etnias y orígenes geográficos. Los tres polimorfismos no sinónimos del TLR2 más conocidos son 1892C>A (Pro631His), 2029C>T (Arg677Trp) y 2258G>A (Arg753Gln), el cual ha sido estudiado en nuestro trabajo. Estos tres polimorfismos sólo se han encontrado en las poblaciones europeas, pero no en asiáticos, africanos o americanos [156]. No sorprende que hayamos encontrado el polimorfismo Arg753Gln entre nuestras muestras, considerando que gran parte de la población Argentina posee ancestros europeos.

Además de su implicancia en la lepra y la tuberculosis, se ha reportado que el polimorfismo 2258G>A (Arg753Gln) impide el reconocimiento mediado por TLR2 de las proteínas del núcleo y NS3 del virus de hepatitis C *in vitro*, lo cual podría ser un factor que aumente la susceptibilidad a esta enfermedad [143]. Asimismo, ha sido asociado al desarrollo de artritis reactiva aguda como consecuencia de la infección con *Salmonella enteritidis* [157], y a una mayor susceptibilidad hacia el desarrollo de endocarditis infecciosa [158]. Por otro lado, este polimorfismo aumenta el riesgo de infección por *citomegalovirus* (*Herpes virus 5*) ya que impide el reconocimiento de la glicoproteína B del virus [159], y el riesgo es mayor en los pacientes trasplantados de hígado que presentan la variante homocigota A/A [160]. También se han observado mayores tasas de recurrencia de infección con bacterias Gram-positivas y de shock séptico inicial en trasplantados de hígado que presentan el polimorfismo Arg753Gln [161]. Aunque los estudios de asociación entre los polimorfismos y las enfermedades infecciosas son más comunes, también se ha reportado que >10% de los pacientes con dermatitis atópica expresan el SNP Arg753Gln. Los monocitos derivados de estos pacientes no expresan IL-8 luego de la estimulación con peptidoglicano, y la expresión del receptor TLR2 mutante está gravemente alterada en los linfocitos T CD4⁺ activados, aunque es restaurada luego de la estimulación con ácido lipoteicoico [153].

Un estudio publicado por Xiong y colegas en el año 2012, demostró que la mutación Arg753Gln hace deficiente la señalización del TLR2, ya que afecta la heterodimerización del receptor con otros TLRs, la fosforilación de los residuos de tirosina del receptor, y el reclu-

tamiento de las proteínas adaptadoras Mal y MyD88, sin afectar su expresión [162]. Debido a que la mutación Arg753Gln se localiza en el dominio TIR y a una distancia significativa de la interfaz de reconocimiento de ligandos en el ectodominio, es poco probable que la mutación tenga un impacto directo sobre el reconocimiento de ligandos. Por esta razón, los autores han especulado que la señalización resulta deficiente debido a que el polimorfismo afecta la interacción cooperativa entre los dominios TIR, al alterar el potencial electrostático y la conformación del TLR2. Sin embargo, tampoco han descartado la posibilidad de que este polimorfismo afecte el tráfico y la localización del TLR2, un mecanismo regulatorio importante de la señalización del receptor [163], análogo al efecto reportado con la mutación Pro631His [164].

En conclusión, nuestros resultados, si bien limitados, sugieren que existiría una relación entre el polimorfismo Arg753Gln del TLR2 y la Leptospirosis humana, aunque harán falta más estudios para su confirmación.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES GENERALES

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES GENERALES

En el Capítulo II, se estudiaron las proteínas BatA (LIC20040) y BatB (LIC20041), codificadas por los genes *lic20040* y *lic20041*, respectivamente. Mediante análisis bioinformático, se determinó que ambas proteínas poseen un dominio von Willebrand Tipo A, el cual ha sido bien documentado en proteínas de origen eucariota, pero también se ha identificado en muchas proteínas procarióticas, aunque éstas no presentan homología aparente entre ellas. Además, fueron predichas como proteínas de composición mixta, localizadas en la membrana interna de *Leptospira*, LIC20040 ubicada sobre el lado citosólico, y LIC20041 atravesando la membrana e interaccionando con LIC20040 en el citoplasma y con el espacio periplásmico en el otro extremo.

Se pudo obtener la proteína LIC20040 recombinante, replegarla a su forma nativa y obtener suero policlonal contra ella pero, lamentablemente, no fue posible expresar LIC20041 recombinante, lo cual limitó nuestro trabajo. Además, el ensayo de localización celular sugirió que LIC20040 es una proteína citosólica. Por otro lado, se identificó la presencia de ambos genes en todas las especies de *Leptospira* cultivadas en nuestro laboratorio, pero los transcritos de *lic20040* no se encontraron en *L. interrogans* serovar Grippityphosa, Icterohaemorrhagiae y Pomona, sugiriendo que su expresión puede ser facultativa, un hecho que deberá ser confirmado en futuros estudios.

Se pudo determinar que LIC20040 recombinante es reconocida por sueros de pacientes convalecientes de Leptospirosis. Por otro lado, esta proteína no mostró tener ningún efecto sobre la agregación de plaquetas humanas en presencia de ristocetina, es decir, el dominio vWA no cumpliría una función agonista para la activación plaquetaria.

Estos resultados contribuyen con la información obtenida con los mutantes Bat en *L. biflexa* que fueron publicados por Stewart y colegas [101], pero ninguno de los dos trabajos lograron dilucidar la función de estas proteínas en *Leptospira*, y ésta permanece aún desconocida.

En el Capítulo III, se presentaron resultados que describen por primera vez el eventual rol de los neutrófilos durante la Leptospirosis aguda murina experimental como parte

de la respuesta inmune innata, y su posible contribución al desarrollo de la respuesta inmune adaptativa contra las leptospiras patogénicas.

Se observó aumento de la bacteremia a 1 d.p.i. y de la carga leptospiral renal a 14 d.p.i. en ratones C57BL/6J depletados de neutrófilos e infectados con LIC, aunque no se observaron diferencias histopatológicas renales en comparación con los controles. Estos animales también presentaron una reducción en los niveles de IgM específica y aumento de IgG1a. Asimismo, se observó un cambio en el perfil Th1 predominante de los animales infectados no depletados hacia un perfil mixto en los ratones depletados de neutrófilos, caracterizado por el aumento de la expresión de IL-4 e IL-17 y la reducción de IL-10, IFN γ e IL-12.

Acorde a los resultados obtenidos, puede decirse que los neutrófilos poseen una modesta contribución en la patogénesis de la enfermedad, controlando la carga bacteriana inicial y modulando parcialmente la respuesta inmune adaptativa subsecuente. Sin embargo, su ausencia no modifica el grado de injuria tisular presente en los órganos infectados. Se deberán realizar otros estudios para investigar qué mecanismo/s están involucrados en el aumento de carga bacteriana observado.

Finalmente, en el Capítulo IV se presentó el primer estudio de asociación entre el polimorfismo Arg753Gln del TLR2 y la Leptospirosis. Si bien brindó información respecto del efecto que la variante alélica A tiene sobre la susceptibilidad a la enfermedad, el número de casos analizados no fue suficiente para la validación estadística. Es importante notar que probablemente haya otros polimorfismos involucrados, ya que sólo el 16,2% de los pacientes confirmados de Leptospirosis presentaron el alelo A, lo cual significa que el resto de los pacientes eran susceptibles a la infección por otra razón. Se requerirán estudios de asociación adicionales, por ejemplo al TLR1 (co-receptor del TLR2) y a otros genes candidatos de la respuesta inmune, para determinar su contribución a la susceptibilidad de infección con *Leptospira interrogans*. La identificación de los polimorfismos del TLR2 como factores de riesgo genético para la infección con *L. interrogans* podría ser beneficioso para el control epidemiológico. Aquellos que hereden genes de alto riesgo para la Leptospirosis probablemente necesitarán mejores medidas de prevención y tratamientos, y chequeos de infección rutinarios.

CAPÍTULO VI

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO VI: MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Productos químicos y enzimas

Los reactivos químicos y de biología molecular utilizados fueron de grado analítico. Todas las soluciones preparadas fueron esterilizadas por tratamiento de calor en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de sobrepresión. Las soluciones termolábiles fueron esterilizadas por filtración con filtro de diámetro de poro de 0,2 µm. Las macromoléculas utilizadas fueron adquiridas en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU), excepto cuando haya aclaración. El agua utilizada en las soluciones fue destilada o bidestilada (según la necesidad), deionizada y esterilizada en autoclave.

6.2. Medios

6.2.1. LB (*Luria-Bertani*)

En este medio se crecieron todas las cepas de *Escherichia coli* (*E. Coli*). Se preparó con triptona 10 g/L, extracto de levaduras 5 g/L y NaCl 10 g/L (para las cepas DH5α, DE3, pLyss), o sin NaCl (para la cepa BL21 SI). Para la preparación de placas, se añadió 15 g/L de agar bacteriológico. Para la selección de colonias positivas de un plásmido determinado, se utilizó medio LB con el agregado de ampicilina (100 µg/ml), ya que los plásmidos utilizados poseen resistencia a este antibiótico.

6.2.2. Medio enriquecido EMJH (*Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris*)

Los cultivos de leptospiras fueron realizados en medio EMJH base (Difco) suplementado con albúmina, polisorbato-80 y factores de crecimiento adicionales para *Leptospira* (Difco) acorde a las indicaciones del fabricante. El medio base contiene cloruro de amonio como fuente de nitrógeno y tiamina como factor de crecimiento. La capacidad de *buffer* es provista por el fosfato disódico y el fosfato monobásico de potasio (pH 7,2 ± 0,2). Además contiene cloruro de sodio que aporta iones esenciales para el crecimiento.

6.3. Cepas bacterianas

6.3.1. Cepas de *Leptospira* spp.

La cepa Fiocruz L1-130 de *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni (LIC) utilizada fue originalmente aislada de un paciente con leptospirosis severa en un brote epidémico en 1996 en San Salvador de Bahía, Brasil, y ha sido descripta previamente [165]. Se prepararon cultivos en medio EMJH líquido y semisólido a 30 °C y en aerobiosis. Las cepas de *L. interrogans* serovares Canicola (Hond Utrecht IV), Grippotyphosa (Moskva V), Icterohaemorrhagiae (RGA) y Pomona (Pomona); las de *L. borgpetersenii* serovar Tarassovi (Perepelicin) y Ballum (Castellonis Castellon 3) y la *Leptospira biflexa* serovar Patoc (Patoc I) fueron cedidas gentilmente por la Dra. Bibiana Brihuega (INTA, Castelar), y cultivadas en medio EMJH a 30 °C en condiciones aeróbicas en nuestro laboratorio.

La virulencia de la LIC fue mantenida por pasajes sucesivos en hámsteres machos (*Mesocricetus auratus*) de 21-28 días de edad. La estandarización de la virulencia y de las propiedades patogénicas del inóculo se logró cultivando el homogenato de un riñón proveniente de un hámster infectado, colectado cuando el animal perdió 20% de su peso corporal, en 20 ml de medio EMJH. El cultivo se alicuotó cuando el número de leptospiras alcanzó 10^8 /ml y se guardó a -80 °C. Luego, para cada inoculación en animales, se descongeló una alícuota y se preparó un cultivo de 10 ml de medio EMJH que se utilizó después de 5 días de crecimiento.

6.3.2. Cepas de *Escherichia coli*

Las cepas *E. coli* utilizadas en el presente trabajo se describen genotípicamente en la **Tabla 6.1.**

6.4. Animales

Los hámsters (*Mesocricetus auratus*) de 3 a 4 semanas de edad y los ratones BALB/c, C57BL/6J y C3H/HeJ de 3 semanas de edad fueron comprados en la Facultad de Veterinaria, UNLP (La Plata, Argentina). Todos los animales recibieron comida y agua *ad libitum*. Todos

los procedimientos experimentales fueron acordes a los principios éticos vigentes para el trato de animales de experimentación.

Tabla 6.1. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas

Cepa	Genotipo relevante	Utilización en este trabajo
DH5α	F- ϕ 80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (rk-,mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 phoA	Amplificación de vectores
BL21 (SI)	F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm endA1 lon-proUp::T7 RNAP::malQ-lacZ (TetS)	Expresión
BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Expresión
BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3) pLysS(cm ^R)	Expresión

6.5. Selección *in silico* de LIC20040 y LIC20041: Análisis bioinformático

Las secuencias codificantes de los genes *lic20040* y *lic20041* fueron identificadas en la base de datos del Proyecto Genoma de *L. interrogans* serovar Copenhageni. La selección fue basada en los dominios funcionales y estructurales predichos con los servidores SMART y PFAM. La presencia de la secuencia putativa *lipobox* fue evaluada con el programa LipoP. La localización celular fue predicha con el servidor PSORT. La estructura secundaria, accesibilidad al solvente y la localización celular también se evaluaron mediante el servidor Predict Protein. En la **Tabla 6.2** se enumeran los links de los servidores y programas virtuales mencionados.

Tabla 6.2. Software utilizado en el análisis bioinformático de los genes *lic20040* y *lic20041*

Servidor/programa virtual	Dirección url	Referencias
Proyecto Genoma de LIC	http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/	[4, 22]
SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/	[166, 167]
PFAM	http://pfam.sanger.ac.uk/	[168]
LipoP	http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/	[169]
PSORT	http://psort.hgc.jp/	[170, 171]
Predict Protein	https://www.predictprotein.org/	[172, 173]

6.6. Aislamiento de DNA genómico

El DNA genómico se extrajo con un método estándar fenol/cloroformo/alcohol isoamílico modificado con adición de proteinasa K. Para ello, se colectaron 5 ml de cada cultivo de *Leptospira* por centrifugación a 11700 rpm durante 30 minutos (min) y se lavaron los *pellets* 2 veces con PBS estéril. Tanto a los *pellets* de bacterias, como a la sangre colectada de los ratones, se agregó 500 µl de *buffer de lisis* (10 mM Tris-HCL pH 7,8, 10 mM EDTA, 0,25% SDS) con 2 µg/ml de proteinasa K, y se incubó durante toda la noche (*overnight*) a 37 °C. Los tejidos fueron homogenizados mecánicamente en el mismo volumen de *buffer de lisis*. A continuación, el procedimiento fue el mismo para todas las muestras: se agregó un volumen de fenol (pH 8) y se centrifugó a 11700 rpm por 15 min a 4 °C. La fase acuosa se extrajo una vez con fenol y luego cuatro veces con medio volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), centrifugando cada paso a 11700 rpm durante 10 min a 4 °C. El DNA se precipitó *overnight* a -20 °C por adición de 100 µl de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y etanol 100% hasta completar 1 ml de volumen, y luego se centrifugó a 11700 rpm durante 10 min a 4 °C. Se realizaron tres lavados con etanol 70%, y luego de la evaporación completa del alcohol, se resuspendió en agua estéril y se incubó a 55-60 °C por 15-20 min. El DNA se almacenó a -20 °C hasta su uso.

El protocolo de extracción de DNA a partir de sangre humana fue modificado para maximizar la lisis de los glóbulos rojos que pueden interferir con la PCR. A 200 µl de sangre en heparina se agregaron 600 µl de *buffer de Lisis de Glóbulos Rojos* (0,155 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA, pH 7,4) y se incubó 10 min a temperatura ambiente, invirtiendo los tubos ocasionalmente. Esto se repitió 3 veces más con 300 µl de *buffer*, centrifugando a 4000 rpm por 5 min y descartando el sobrenadante entre paso y paso, hasta observar un *pellet* blanco. A continuación, al *pellet* se agregó 191,25 µl de *buffer de lisis* (10 mM Tris-HCL pH 7,8, 10 mM EDTA, 0,25% SDS) y 2 µg/ml de proteinasa K, incubando a 55 °C durante 1 hora. Se realizaron dos extracciones de la fase acuosa con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y luego se precipitó el DNA agregando 60 µl de NaCl 5 M y 540 µl de etanol 96°, incubando ON a -20 °C. Se realizaron tres lavados con etanol 70%, y luego de la evaporación completa del alcohol, se resuspendió en agua estéril y se incubó a 55-60 °C por 15-20 min. El DNA se almacenó a -20 °C hasta su uso.

6.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los fragmentos de DNA fueron amplificados con Taq Polimerasa (PB-L, Argentina), utilizando oligonucleótidos específicos, los cuales se enumeran en la **Tabla 6.3**. Para la amplificación de los genes de LIC, se diseñaron los oligonucleótidos según la secuencia genómica de LIC (número de acceso GenBank AE016823). Los oligonucleótidos “*tlr2* SNP” sólo amplifican un fragmento del gen *tlr2*.

La mezcla de reacción consistió de *buffer* Taq Polimerasa 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl), 250 μ M de cada dNTP, 0,5 μ M de cada oligonucleótido, 2 mM MgCl₂, 0,5 unidades (U) de Taq Polimerasa, 100 ng de DNA genómico y agua estéril hasta volumen final de 20 μ l por tubo. Para los genes *lic20040* y *lic20041*, la desnaturalización inicial se llevó a cabo a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 30 segundos (seg) a 94 °C, 40 seg a 48 °C y 1 min 20 seg a 72 °C cada uno, y una extensión final a 72 °C por 6 min. Para la amplificación del gen *rRNA 16s* o la actina genómica, la desnaturalización inicial se llevó a cabo a 94 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C (*rRNA 16s*) o 61 °C (β -actina) y 30 seg a 72 °C cada uno, y una extensión final a 72 °C por 2 min. Por último, la amplificación del fragmento del gen *tlr2* se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 94 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 56 °C y 30 seg a 72 °C cada uno, y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1-1,5%, dependiendo del tamaño de los fragmentos, según se describe en la sección 6.6.2.

6.6.2. Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de DNA fueron sembradas con *buffer de siembra* (0,25% azul de bromofenol, 40% p/v sacarosa en agua). La electroforesis fue realizada en *buffer* TAE (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA) con 1% de bromuro de etidio. El voltaje así como el tiempo de corrida dependieron de la muestra y el porcentaje de agarosa del gel. La migración de las bandas se observó en un transiluminador de luz UV de 310 nm (Fotodyne o Stratagen, EEUU) y las imágenes se capturaron con el software *Electrophoresis Documentation and Analysis System 120* (Kodak).

Tabla 6.3. Oligonucleótidos empleados en los ensayos de PCR

Genes	Nombre	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)	Longitud (pb)
<i>lic20040</i>	LIC20040 FW ¹	ATCATCGGATCCTTTATATATTATAAAAAC	48	906 ³
	LIC20040 REV ²	ATCATCAAGCTTTCATACATAATATCTCAG		
<i>lic20041</i>	LIC20041 FW ¹	ATCATCGGATCCACTATTAGAATATTTTTG	48	996 ³
	LIC20041 REV ²	ATCATCAAGCTTTCATATTACAGAAACCG		
<i>rRNA 16s</i>	LEPTO FW	CATTCATGTTTCGAATCATTTCAA	55	331
	LEPTO REV	GGCCCAAGTTCCTTCTAAAAG		
<i>B-Actina</i>	A1 FW	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	61	241
	A2 REV	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT		
<i>tlr2 SNP</i>	R753Q FW	CATTCCCCAGCGTCTCTGCAAGCTCC	56	129
	R753Q REV	GGAACCTAGGACTTTATCGCAGCTC		

¹ El sitio de restricción para BamHI se muestra subrayado.

² El sitio de restricción para HindIII se muestra subrayado.

³ Sin péptido señal.

6.6.3. Purificación de fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA fueron purificados a fin de eliminar los reactivos provenientes de la PCR (oligonucleótidos, enzima, etc) que podrían interferir con los procedimientos posteriores. Para ello, se realizó una electroforesis en gel de agarosa, como se describe en la sección 6.6.2., y la banda de interés se cortó con un bisturí y se colocó en un tubo *eppendorf*, tratando de exponer el menor tiempo posible el gel de agarosa a la luz UV para evitar la formación de dímeros de timina y mutaciones no deseadas. La purificación se realizó con el kit *Nucleospin Extract II* (Macherey-Nagel), según las instrucciones del fabricante. Finalmente, el DNA fue resuspendido en agua estéril y almacenado a -20 °C.

6.7. Clonado de las proteínas recombinantes

Los fragmentos LIC20040 y LIC20041 fueron clonados primero en el vector *pGEM-T Easy Vector* (Promega), según las instrucciones del fabricante, y luego subclonados en el plásmido pAE. Este plásmido es un derivado de los vectores pET3-His y pRSET para la expresión y purificación de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* basado en la RNA Polime-

rasa del fago T7 [98]. El plásmido pAE combina las ventajas de ambos vectores: tiene un tamaño pequeño ($2,8 \times 10^3$ pb), un número de copias de plásmido por célula alto (200-250 copias) (pRSET) y expresa una secuencia corta de 6 histinas (HisTag) en el extremo N-terminal (pET3-His). Esto facilita el subclonado y los procedimientos de secuenciación en comparación con el sistema pET, y resulta en un alto nivel de expresión de las proteínas recombinantes. Además, el plásmido pAE posee un gen de resistencia a ampicilina, el cual permite la selección de las bacterias que lo contienen en presencia de este antibiótico. En la **Figura 2.6** se muestran las construcciones pAE-LIC20040 y pAE-LIC20041. También se verificó que el marco de lectura de los plásmidos fuera el correcto mediante secuenciación (Macrogen, Korea).

6.7.1. Digestión de DNA con enzimas de restricción

Para clonar cualquier fragmento de DNA en un plásmido determinado, primero es necesario digerir ambas moléculas con las mismas enzimas de restricción. En este caso, ambos productos de PCR, LIC20040 y LIC20041, fueron amplificados con oligonucleótidos que contenían los sitios de restricción para las enzimas *BamHI* (en el *forward*) y *HindIII* (en el *reverse*) en su secuencia (**Tabla 6.3**). El plásmido pAE también posee estos sitios en su sitio múltiple de clonado.

Por lo tanto, las tres moléculas se digirieron con las enzimas *BamHI* y *HindIII* (Promega) en un volumen de 20 μ l. La mezcla de reacción consistió de *buffer* E 1X (Promega, compatible 100% con ambas enzimas), 0,1 mg/ml BSA, 5 U de cada enzima, 1 μ g de DNA y agua estéril hasta completar volumen. Se incubó durante 2 horas a 37 °C y luego 5 min a 70 °C para inactivar las enzimas. La digestión se corroboró por electroforesis en gel de agarosa, como se describe en la sección 6.6.2., y las bandas digeridas fueron purificadas como se describe en la sección 6.6.3.

6.7.2. Reacción de ligación

En la ligación entre un vector y un fragmento de DNA (inserto) es importante conocer la concentración de cada uno, ya que la reacción depende de la relación molar entre las moléculas, entre otros factores. Conociendo la masa del vector y los tamaños de ambas moléculas, es posible calcular la masa necesaria de inserto para cada relación molar que se quiera ensayar. Para ello, se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Masa Vector (ng)} \times \text{Tamaño inserto (pb)} / \text{Tamaño vector (pb)} \times I/V = \text{Masa inserto (ng)}$$

I/V representa la relación molar inserto/vector. En este caso, se ensayaron las relaciones 1:1 y 3:1.

La mezcla de reacción consistió de *buffer* T4 DNA Ligasa 1X (Promega), vector e inserto en las cantidades calculadas, 1 U de T4 DNA Ligasa (Promega) y agua estéril hasta completar 10 μ l de volumen por tubo. Se hicieron los siguientes controles:

- ✓ Vector sin inserto y con ligasa: Control de digestión
- ✓ Vector sin inserto y sin ligasa: Control de digestión
- ✓ Inserto y ligasa: Control de contaminación

Las ligaciones se incubaron a temperatura ambiente (25 °C) durante 1 hora y luego en baño de agua a 18 °C *overnight*. Se tomaron alícuotas para la transformación de bacterias y el remanente se almacenó a -20 °C.

6.7.3. Transformaciones de bacterias competentes

Para las transformaciones se empleó un electroporador *Gene Pulser TM* (Bio-Rad, EEUU). Se electroporaron 50 μ l de bacterias DH5 α con 2,5 μ l de las respectivas reacciones de ligación, o bacterias BL21 (SI, DE3 o pLysS) con 1 μ l de construcción plasmídica. Estas mezclas se colocaron en una cubeta de electroporación fría de 0,2 cm de distancia entre los electrodos y la mezcla se sometió a un pulso de $2,2 \times 10^3$ Voltios. Las variables capacitancia y resistencia se fijaron en 25 microfaradios y 200 ohm (Ω), respectivamente. Inmediatamente

luego del pulso eléctrico, se añadió 450 µl de medio LB sin antibiótico a las bacterias (LB sin NaCl para las bacterias BL21) y, luego de trasvasarlas a tubos *eppendorf*, se las incubó 1 hora a 37 °C con agitación. A continuación, se centrifugaron los tubos a 14000 rpm por 1 min para decantar las células. Se descartaron 250 µl de medio y el resto se utilizó para resuspender las bacterias y sembrar en placas, las cuales se incubaron 18-24 hs a 37 °C. La selección de transformantes se efectuó en placas de LB (con o sin NaCl, dependiendo de las bacterias) con agregado de ampicilina (100 µg/ml). Para la selección de los clones en pGEM-T, además se agregó a cada placa IPTG (100 µl de un stock 0,1M) y X-Gal (20 µl de un stock 50 mg/ml), ya que este vector contiene el gen *lacZ*, cuya expresión se ve interrumpida cuando ingresa otro fragmento de DNA en su secuencia. De esta manera, las colonias positivas presentan una coloración blanca, y las negativas son azules.

6.7.4. Identificación de transformantes por Colony PCR

La identificación de los transformantes positivos que contenían el inserto de interés se realizó por PCR, con los mismos oligonucleótidos que fueron utilizados en el clonado (ver **Tabla 6.3**). Para ello, cada colonia individual se picó con un escarbadietes estéril, se estrió en una nueva placa con medio selectivo y el remanente se disolvió en 20 µl de agua. Luego de hervir todas las muestras durante 10 min para romper las bacterias, se centrifugó durante 1 min a máxima velocidad (14000 rpm) para obtener el sobrenadante y utilizarlo como molde de DNA. La reacción de PCR se realizó de la misma manera que se describe en la sección 6.6.1.

Una vez identificados los clones positivos, se inocularon 10 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) con las estrías realizadas previamente y se incubó *overnight* a 37 °C con agitación. Parte de este volumen se empleó para la extracción de los plásmidos mediante el método de lisis alcalina descrito en la sección 6.7.5., y el resto del inóculo se almacenó como stock a -80 °C con 30% de glicerol para evitar la cristalización de las bacterias.

6.7.5. Método de lisis alcalina para la extracción de plásmidos

El protocolo estándar ha sido descrito previamente [174]. Brevemente, se crecieron inóculos de los clones de interés hasta saturación y se centrifugaron 4,5-5 ml de cada uno a 14000 rpm durante 1 min. Las bacterias se resuspendieron con vórtex en 200 µl de Solución I (50 mM de Glucosa, 25 mM Tris-HCL pH 8 y 10 mM EDTA pH 8), con 5 µl de RNasa 1 mg/ml (Sigma) para eliminar impurezas de RNA. Inmediatamente se agregó 400 µl de la Solución II (partes iguales de 0,4 M NaOH y 2% SDS) preparada en el momento, se mezcló dos veces por inversión y se incubó durante 3 min en hielo. Luego, se agregó 300 µl de Solución III (3M potasio, 5M acetato pH 4,8), incubando 10 min más en hielo y finalmente se centrifugó a 14000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se agregó un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se vortexeó unos segundos y se centrifugó a máxima velocidad por 1 min para separar las fases. La fase acuosa (superior) que contenía los plásmidos se transfirió a otro tubo y se repitió la extracción con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). A continuación, a la fase acuosa se agregó 15 µl de sílica (Sigma), la cual une el DNA, y se incubó a temperatura ambiente durante 5-10 min. Finalmente, se dio un spin en la centrífuga, se realizaron dos lavados de la sílica con 500 µl de solución *New Wash GeneClean* (MP Biomedicals) y se resuspendió en 30 µl de agua estéril tibia para facilitar el desprendimiento del DNA de la sílica. Se incubó durante 1 min, se centrifugó unos segundos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Los plásmidos se almacenaron a -20 °C.

6.8. Preparación de células electro-competentes

A partir del stock en glicerol de la cepa bacteriana deseada, se realizó un estriado en placa de LB sin antibiótico para aislar colonias y comprobar existencia de contaminaciones. Una colonia individual se inoculó en 10 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó *overnight* a 37 °C con agitación. Luego, se inocularon 250 ml de medio LB sin antibiótico con una dilución 1/50 – 1/100 del inóculo saturado, y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm de aproximadamente 0,4-0,6.

Las células se colectaron en tubos falcon de 50 ml por centrifugación a 4000 rpm durante 20 min en frío (4 °C). Luego de descartar el sobrenadante, se resuspendieron en glicerol 10% estéril helado y se volvió a centrifugar de la misma manera. Este paso se repitió dos veces más con el cuidado de mantener las bacterias siempre bien frías y en esterilidad. Finalmente, se descartó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en el volumen remanente de glicerol 10% (1 ml aproximadamente). Se realizaron alícuotas de a 50-100 µl y se almacenaron a -80 °C para su uso posterior.

6.9. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Se transformaron células *E. coli* BL21 (SI, DE3 o pLysS) con cada una de las construcciones plasmídicas y se crecieron en placas para aislar colonias individuales (ver sección 6.7.3.).

Se incubaron 250 ml de medio LB (sin NaCl) conteniendo ampicilina (100 µg/ml) con una dilución 1/100 de un inóculo saturado (crecido a partir de una colonia individual), y se incubó a 30 °C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm de aproximadamente 0,7-0,8. La síntesis de la proteína recombinante fue inducida por adición de NaCl 0,3 M (concentración final), siguiendo con la incubación 12 horas más.

Las células se colectaron por centrifugación a 4000 rpm durante 20 min a 4 °C y fueron resuspendidas en 10 ml de Solución de Sonicado. La composición de esta solución, y del resto de las soluciones que se mencionan en esta sección, se detallan en la **Tabla 6.4**. Las bacterias fueron lisadas mediante sonicación, con ciclos de 10 segundos a una potencia mayor al 70%, manteniendo el frío para retrasar la acción de las proteasas. Además, se inhibió la acción de estas enzimas por adición de 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo o PMSF (del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*), un inhibidor de serinproteasas. Las fracciones soluble e insoluble se separaron por centrifugación a 10000 rpm durante 30 min. La fracción insoluble fue lavada dos veces con 25 ml de Solución de Lavado para eliminar impurezas, centrifugada a 10000 rpm durante 10 min, y finalmente solubilizada en 2-5 ml de Solución de Solubilización.

La purificación de las proteínas recombinantes se logró por cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC), siguiendo las instrucciones del fabricante. En este caso, se utilizó una resina de ácido nitrilotriacético cargada con níquel (Ni^{2+} -NTA, Qia-gen, EEUU) de flujo rápido, el cual posee afinidad por las histidinas fusionadas a las proteínas recombinantes. Se realizaron lavados con concentraciones crecientes de imidazol (20, 40, 60 y 80 mM), que compite con las histidinas, y finalmente se realizó la elución con imidazol 250 mM pH 8. Se colectaron fracciones de 1 ml que fueron analizadas por electroforesis en SDS-PAGE 10% (sección 6.9.1.).

Las proteínas recombinantes se replegaron por diálisis en un paso durante 24 horas en 2 litros de *Buffer* de Replegado, con continua agitación y en heladera.

6.9.1. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

En este tipo de electroforesis, las proteínas son separadas de acuerdo a su tamaño, ya que en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico que elimina las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas sin alterar los puentes disulfuro, todas adquieren carga negativa en proporción a su masa. El procedimiento ha sido descrito previamente [175]. Brevemente, las muestras proteicas se mezclaron en proporción 4:1 con *Buffer* de Siembra 5X, se hirvieron durante 5-10 min para facilitar la desnaturalización de las proteínas y se centrifugaron 1 min a máxima velocidad (14000 rpm). A continuación, se sembró entre 5-40 μl de muestra en el gel de poliácridamida, preparado según el protocolo estándar, y se corrió en *Buffer* de Corrida 1X a 90-150 voltios. Una vez finalizada la corrida, los geles se tiñieron con Coomassie Blue, con posterior destinción en Solución de Destinción para la visualización de las bandas. Todas las soluciones empleadas se encuentran detalladas en la **Tabla 6.4**.

Tabla 6.4. Soluciones utilizadas en la expresión, purificación y separación de proteínas

Solución	Composición
Solución de Sonicado	Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 100 mM
Solución de Lavado	Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, Urea 2 M, β -mercaptoetanol 10 Mm
Solución de Solubilización	Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, Urea 8 M
Buffer de Replegado	Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM
Buffer de Siembra 5X	SDS 10% (p/v), β -mercaptoethanol 10 Mm, glicerol 20% (p/v), Tris-HCl 0,2 M pH 6,8, bromofenol blue 0,05% (p/v)
Buffer de Corrida 1X	Tris-HCl 25 mM, Glicina 200 mM, SDS 0,1% (p/v)
Coomassie Brilliant Blue	Metanol 50% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v), Coomassie Blue R-250 0,25% (p/v)
Solución de Destinción	Etanol 40% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v)

6.10. Producción de antisuero policlonal

Se inmunizaron ratones BALB/c hembras de 3 semanas de edad con 10 μ g totales (50 μ g/ml) de la proteína recombinante por vía subcutánea. Como adyuvante se empleó Alhydrogel (2% Al(OH)₃, Brenntag Biosector, Denmark). Se dieron dos inyecciones de refuerzo en períodos de 2 semanas de intervalo con la misma preparación proteica. Los controles negativos fueron inyectados con PBS. Una semana después de cada inmunización, los animales fueron sangrados por el plexo retro-orbital y el suero fue analizado por Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) para la titulación de los anticuerpos (ver sección 6.12.1.).

6.11. Western Blot

Las muestras se sembraron en geles de SDS-poliacrilamida 10% (sección 6.9.1.) y se transfirieron a membranas de PVDF (polifluoruro de vinilideno; Hybond ECL, GE Healthcare) con un equipo de transferencia semi-seca. Las membranas se bloquearon *overnight* a 4 °C con 5% (p/v) de leche descremada en PBS con 0,1% Tween-20 (PBS-T) y luego se incubaron 2 horas a 37 °C con suero policlonal anti-LIC20040 (1:500), anti- β -actina (1:500) o anti-His (1:3000, Invitrogen). Luego de efectuar varios lavados en PBS-T, se incubó las membranas con 1:2000 IgG anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano o HRP (del inglés *horseradish*

peroxidase) durante 1 hora a 37 °C. La reactividad fue revelada por electroquimioluminiscencia (ECL).

Cuando se necesitó incubar la membrana con más de un anticuerpo, se realizó un tratamiento de *stripping* que consistió en incubar la membrana a 60 °C durante 30 min en *buffer* de *stripping* (β -mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8) y luego lavarla varias veces con PBS-T.

6.12. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

6.12.1. Evaluación del suero policlonal

Se sembraron placas de 96 *wells* con 5 μ g/ml de proteína recombinante en PBS y se incubó *overnight* en heladera. A continuación, la placa se bloqueó con 5% de leche descremada en PBS-T durante 1 hora a 37 °C para disminuir el pegado inespecífico. Luego de lavar la placa tres veces con PBS-T, se realizaron diluciones seriadas al medio de las muestras de suero (a partir de 1:20), incubando 2 horas a 37 °C. La placa se lavó tres veces con PBS-T y se incubó 1 hora a 37 °C con una dilución 1:4000 de IgG anti-ratón de cabra conjugado HRP. Finalmente, se lavó nuevamente tres veces con PBS-T y se reveló con 1 mg/ml de o-fenilendiamina (OPD) en *buffer* citrato-fosfato pH 5 (24,3% ácido cítrico 0,1M, 25,7% fosfato disódico 0,2M), más 1 μ l/ml de agua oxigenada 30 volúmenes. La reacción prosiguió durante 15-20 min y se detuvo agregando 50 μ l de ácido sulfúrico 4N en cada *well*. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector de microplacas (TP-reader, Thermo) contra la absorbancia de controles.

6.12.2. Detección de anticuerpos contra la proteína recombinante en sueros humanos

El procedimiento fue similar al descrito en la sección 6.12.1. La evaluación de anticuerpos se realizó con una dilución 1:2000 de IgG anti-humano de conejo conjugado a biotina (Sigma) y posterior incubación de 1 hora a 37 °C con estreptavidina conjugada a HRP (1:4000; Sigma).

6.12.3. Detección de la localización celular de Bata

Las placas de 96 wells fueron sembradas con 10^6 leptospiras (*L. interrogans* Copenhageni) fijadas en paraformaldehído 4% o hervidas y resuspendidas en *buffer* carbonato pH 9,6 (carbonato de sodio 1,5 mM, bicarbonato de sodio 3,5 mM), incubándose *overnight* en heladera. A continuación, se bloqueó con 5% de leche descremada en PBS-T durante 1 hora a 37 °C y luego se incubó 2 horas más con el suero policlonal contra la proteína recombinante. El ensayo prosiguió de manera similar a la descrita en la sección 6.12.1.

6.12.4. Detección de anticuerpos anti-LIC IgM e IgG totales y determinación de las subclases de IgG

Las placas de 96 wells fueron sembradas con 10^6 leptospiras (*L. interrogans* Copenhageni) inactivadas por calor y resuspendidas en *buffer* carbonato pH 9,6 (carbonato de sodio 1,5 mM, bicarbonato de sodio 3,5 mM), incubándose *overnight* en heladera. Las placas se bloquearon con 5% de leche descremada en PBS-T durante 1 hora a 37 °C para disminuir el pegado inespecífico, y luego 2 horas a 37 °C con las diluciones seriadas al medio de los sueros murinos (14 d.p.i.), empezando con una dilución 1:20. A continuación, se lavó la placa tres veces con PBS-T y se incubó 1 hora a 37 °C con una dilución 1:4000 en PBS-T de IgG, IgG1a o IgG2 o 1:2500 de IgM anti-ratón de cabra conjugado HRP. El ensayo prosiguió de manera similar a la descrita en la sección 6.12.1.

6.13. Ensayo de agregación de plaquetas

6.13.1. Obtención y purificación de plaquetas humanas

Se recolectaron muestras de sangre periférica de donadores sanos empleando citrato de sodio 3,8% como anticoagulante hasta una concentración 20 mM final. El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo por centrifugación a 180 x g durante 15 minutos a 22 °C. También se obtuvo plasma pobre en plaquetas (PPP) por centrifugación a 1800 x g durante 20 minutos a 22 °C. Las plaquetas lavadas (PL) se prepararon por centrifugación del PRP (900 x g 10 min) en presencia de prostaciclina 75 nM (PGI₂, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EEUU)

para evitar la activación plaquetaria. Luego de descartar el plasma, las células se resuspendieron en *buffer* de lavado (NaCl 140 mM; KCl 2,5 mM; NaHCO₃ 0,1 mM; NaPO₄H₂ 0,5 mM; MgCl₂ 1 mM; citrato de sodio 22 mM; glucosa 0,1% p/v; BSA 3,5% p/v; pH 6,5) y fueron centrifugadas nuevamente (900 x g 10 min) [176]. Finalmente, las plaquetas fueron resuspendidas en *buffer Tyrode* (NaCl 134 mM; NaHCO₃ 12 mM; KCl 2,9 mM; Na₂HPO₄ 0,34 mM; MgCl₂ 1 mM; HEPES 10 mM; glucosa 5 mM; BSA 0,35%). Se agregó Ca²⁺ 1 mM previo a la estimulación.

6.13.2. Agregación plaquetaria

Se incubaron 3x10⁵/μl plaquetas humanas lavadas (PL) (libres de plasma y resuspendidas en *buffer Tyrode*) con 100 μl de PPP (como fuente de vWF), o la proteína recombinante en dos concentraciones diferentes: 1) la misma concentración empleada para la obtención de anticuerpos anti-rLIC20040 que resultó eficiente para activar la respuesta inmune en los ratones BALB/c (50 μg/ml o 10 μg totales) y 2) una concentración diez veces superior (500 μg/ml o 100 μg totales). Luego, las plaquetas se estimularon con la adición de ristocetina 1 mg/ml (Bio/Data Corporation, EEUU). La agregación plaquetaria se midió en un agregómetro como la disminución de la densidad óptica (DO) en función del tiempo, es decir, a menor DO, mayor porcentaje de agregación. La agregación plaquetaria fue evaluada a 37 °C utilizando el método turbidimétrico mediante el empleo de un agregómetro (Chrono Log, Havertown, EEUU). Esta técnica se basa en el registro de los cambios de densidad óptica que sufre una suspensión de plaquetas durante la agregación. Inicialmente, se coloca la suspensión en un tubo de vidrio siliconado. Dentro del agregómetro, el tubo es atravesado por un haz de luz y la transmisión de la misma es captada por una célula fotoeléctrica que genera una señal graficada por un registrador. Para que las plaquetas se agreguen, es necesario optimizar el contacto entre ellas a 37°C, lo cual se logra colocando un imán en el tubo que produce agitación gracias a un sistema magnético y un termostato. Cuando las plaquetas no se han agregado, no hay transmisión de luz y la densidad óptica es máxima. Cuando se adiciona un agonista y las plaquetas comienzan a agregarse, la transmisión de luz aumenta y la densidad óptica decrece. El trazado correspondiente a estos cambios se observa como una curva [177].

6.14. Depleción de neutrófilos

Los ratones C57BL/6J fueron depletados de neutrófilos Ly-6G^{high} mediante la administración intraperitoneal (i.p.) del anticuerpo monoclonal específico anti-Ly6G de rata, 1A8 (BioXCell, NH, EEUU), en dosis de 0,5 mg/200 µl PBS el día anterior a la infección con LIC, y luego media dosis cada 48 hs para mantener la depleción. El grupo control fue tratado con una dosis similar de IgG total de rata (Sigma).

6.14.1. Recuento de neutrófilos

Para comprobar el efecto del anticuerpo 1A8 sobre la depleción de los neutrófilos, se realizaron hemogramas de sangre entera en un contador hematológico veterinario (Abacus Jr. Vet, Austria), en la Academia Nacional de Medicina, antes de la depleción y 24 hs después de la administración del anticuerpo. Asimismo, se confirmó la depleción cada 48 hs mediante el recuento diferencial de leucocitos en una cámara de Neubauer, utilizando el método de frotis con la subsiguiente tinción con May-Grüwal-Giemsa. El método de frotis simplemente consiste en disponer una gota de sangre sobre un portaobjetos y esparcirla con un cubreobjetos para que quede una capa traslúcida.

6.15. Aislamiento de esplenocitos e inducción de la expresión de citoquinas

Los esplenocitos son las células que componen el bazo, en su mayoría linfocitos B y T. Para aislar estas células, se colectaron los bazos de todos los animales al finalizar el experimento (14 d.p.i.) en medio RPMI-10 (medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino para mantener la viabilidad celular). Los esplenocitos se extrajeron presionando los bazos contra una malla metálica sobre una caja de Petri conteniendo 1-2 ml de medio RPMI-10. Luego, la suspensión fue transferida a un tubo falcon de 15 ml y se llevó a 4 ml con el mismo medio. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 8 °C y se resuspendieron en 4 ml de cloruro de amonio 0,1 M para lisar los glóbulos rojos. La suspensión se vortexeó unos segundos y se incubó en hielo durante 3-4 minutos, se completó con 10 ml de medio RPMI-10 y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a 8 °C. El sobrenadante se des-

cartó y el procedimiento se repitió otra vez para asegurar la lisis completa de los eritrocitos. Finalmente, las células se lavaron con el medio RPMI-10, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 8 °C y se resuspendieron en 500 µl del mismo medio. El recuento de los esplenocitos se realizó en una cámara de Neubauer utilizando el colorante azul tripán, el cual ingresa sólo en las células no viables, dejando a las viables incoloras. Se realizaron suspensiones con una concentración de 10^7 células en 2 ml de medio RPMI-10, las cuales fueron estimuladas con 4×10^7 LIC inactivadas por calor en 100 µl del mismo medio (aproximadamente 3 bacterias por cada célula). Luego de incubar las células 24 hs a 37 °C con 5% CO₂, se centrifugaron todas las suspensiones y los *pellets* de células se resuspendieron en 500 µl de Trizol® Reagent (Invitrogen).

6.16. Extracción de RNA y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

Para extraer el RNA total de las leptospiras, se centrifugaron 5 ml de cada cultivo a 10000 rpm durante 15 minutos y los *pellets* se resuspendieron en 500 µl de Trizol® Reagent (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA extraído de las muestras de leptospiras y de esplenocitos (sección 6.14) se incubó con DNAsa I para eliminar los restos de DNA. Luego, para la síntesis del cDNA se utilizaron 500 ng de RNA, hexámeros aleatorios y la transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. La integridad del cDNA se comprobó mediante PCR, amplificando el gen *rRNA 16s* o el gen de β-actina, según se describe en la sección 6.6.1.

6.17. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

El análisis por PCR en tiempo real permite calcular el número de copias del gen amplificado (DNA o cDNA) a medida que transcurre la reacción, a partir de una curva de calibración que debe ser específica de dicho producto. Por esta razón, es una herramienta útil para cuantificar o medir la expresión de genes.

Para la confección de las curvas de calibración, primeramente se debe contar con el producto purificado y cuantificado. Los genes *rRNA 16s*, β -actina y los correspondientes a las citoquinas interleuquina 4 (IL-4), IL-10, IL-12, IL-17 e interferón gamma (IFN γ) fueron clonados con oligonucleótidos específicos en vectores comerciales (pGEM-T, pLoc), y purificados con el kit *Nucleospin Extract II* (Macherey-Nagel), según las instrucciones del fabricante. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados, sus temperaturas de *annealing* y el tamaño de los productos se enumeran en la **Tabla 6.5**. Luego de cuantificar las muestras en un espectrofotómetro (NanoDrop, Thermo Scientific), se realizaron diluciones seriadas por triplicado que fueron utilizadas como moldes para la amplificación por PCR en tiempo real. La corrida y el análisis de los datos se realizaron con el instrumento Line-Gene FQD-48A (Bioer Technology Co., LTD).

Tabla 6.5. Oligonucleótidos empleados en los ensayos de PCR en tiempo real

Genes	Nombre del oligonucleótido	Secuencia nucleotídica (5'-3')	TA (°C)	Longitud (pb)
β-actina	β -actina Fw	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	61	241
	β -actina Rv	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT		
β-actina cDNA	qActina Fw	CGTCATCCATGGCGAACTG	58	60
	qActina Rv	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT		
rRNA 16s	Lepto Fw	CATTCATGTTTTCGAATCATTTCAAA	55	331
	Lepto Rv	GGCCCAAGTTCCTTCTAAAAG		
Interleuquina-4	IL-4 Fw	CATCGGCATTTTGAACGAGGTCA	58	240
	IL-4 Rv	CTTATCGATGAATCCAGGCATCG		
Interleuquina-10	IL-10 Fw	GTGGAGCAGGTGAAGAGTGATTT	58	324
	IL-10 Rv	CCAAGGAGTTGTTTCCGTTAGC		
Interleuquina-12	IL-12 Fw	ATGGCCATGTGGGAGCTGGAGAAAG	65	255
	IL-12 Rv	GTGGAGCAGCAGATGTGAGTGGCT		
Interleuquina-17	IL-17 Fw	ACCGCAATGAAGACCCTGAT	56	83
	IL-17 Rv	TCCCTCCGCATTGACACA		
Interferón-γ	INF- γ Fw	CTTGGATATCTGGAGGAACTGGC	55	234
	INF- γ Rv	GCGCTG ACCTGTGGGTTGTTGA		

TA: temperatura de *annealing*

Se utilizó la *TAQurate Green real-time PCR MasterMix* para todas las reacciones, según las instrucciones del fabricante. El ciclado consistió de una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 65 ciclos de 20 segundos a 94 °C, 15 segundos a las respectivas temperaturas de *annealing* y 15 segundos a 72 °C, y finalmente una extensión final de 2 minutos a 72 °C. Las curvas de *melting*, que son una medida de la identidad del producto, se realizaron inmediatamente después de la amplificación, con un incremento de temperatura de 0,3 °C/segundo entre los 70 °C y 89 °C, con continua adquisición de fluorescencia. Además, se comprobó el tamaño de los amplicones por electroforesis en gel de agarosa.

6.18. Histología e inmunohistoquímica

Los cortes histológicos de los riñones provenientes de los ratones C57BL/6J fueron montados en portaobjetos, y teñidos con hematoxilina/eosina. La nefritis fue evaluada por un patólogo profesional (Dr. Ricardo Drut, Facultad de Medicina-UNLP) en una escala entre 0-4 en una sección longitudinal completa del órgano, según criterios previamente publicados para calificar las lesiones renales presentes en la leptospirosis [178]. La calificación fue como sigue:

- ✓ *Grado 0*: ausencia de infiltrados inflamatorios o necrosis
- ✓ *Grado 1*: inflamación mínima (1-5 focos)
- ✓ *Grado 2*: inflamación leve (<25% de la sección afectada, o 6-10 focos)
- ✓ *Grado 3*: inflamación moderada (25-50% de la sección afectada o 11-20 focos)
- ✓ *Grado 4*: inflamación severa (>50% de la sección con infiltrados inflamatorios, o >20 focos)

Para la inmunohistoquímica, los cortes fueron rehidratados y calentados en *buffer* citrato (citrato de sodio 10 mM, 0,05% Tween-20, pH 6) en una olla a presión durante 20 minutos. Luego, cuando los cortes se enfriaron, se sumergieron en agua oxigenada al 3% para inhibir la actividad peroxidasa endógena. Los sitios antigénicos inespecíficos se bloquearon

con suero normal de cabra al 5% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los cortes se incubaron con una dilución 1:200 de antisuero policlonal murino anti-LipL32 (gentileza de la Dra. Nascimento del Instituto Butantán, Brasil) durante 1 hora a 37 °C. Se realizaron varios lavados con PBS y después se incubó con el anticuerpo secundario, IgG anti-ratón de cabra biotinilado, seguido de la incubación con estreptavidina conjugada a peroxidasa (DAKO, EEUU). Para el revelado, se sumergieron los cortes en una solución de diaminobenzidina (DAB) con agua oxigenada, hasta que la reacción llegó a la intensidad de color deseada. Finalmente, se realizó una contratinción con hematoxilina y los cortes fueron deshidratados y montados con un cubreobjetos. La observación se realizó en un fotomicroscopio Nikon E200.

6.19. Digestión de fragmentos del gen *tlr2*

La mezcla de reacción consistió de *buffer* Tango 1X (Thermo Scientific), el cual ya contiene BSA, 5 U de la enzima de restricción MspI (Thermo Scientific), 1 µg de DNA y agua estéril hasta completar volumen de 20 µl. Se incubó durante >16 horas a 37 °C y luego se corroboró la digestión por electroforesis en gel de poliacrilamida 10% nativo, preparado según el protocolo estándar pero sin el agregado de SDS. Los geles se corrieron en *Buffer* de Corrida 1X (**Tabla 6.4**) a 75 voltios. Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles se incubaron con bromuro de etidio para la visualización de las bandas y se observaron en el transiluminador de luz UV de 310 nm (Fotodyne o Stratagen, EEUU) y las imágenes se capturaron con el software *Electrophoresis Documentation and Analysis System 120* (Kodak).

6.20. Análisis estadístico

En los gráficos de barras, los datos han sido expresados como promedio ± error estándar de la media o SEM (del inglés, *standard error of the median*). Las diferencias entre los grupos se determinaron con la prueba *t* de Student o el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías, con posterior aplicación del test de comparación múltiple de Bonferroni, según correspondiera. El análisis de contingencia se realizó mediante el Test Exacto de Fisher. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.



BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

1. Adler, B. and A. de la Pena Moctezuma, *Leptospira and leptospirosis*. Vet Microbiol, 2010. **140**(3-4): p. 287-96.
2. Zuerner, R.L., *Laboratory Maintenance of Pathogenic Leptospira*, in *Current Protocols in Microbiology*. John Wiley & Sons, 2005. **Chapter 12**: p. Unit 12E.1.1–12E.1.13.
3. Li, S., et al., *Replication or death: distinct fates of pathogenic Leptospira strain Lai within macrophages of human or mouse origin*. Innate Immun, 2010. **16**(2): p. 80-92.
4. Nascimento, A.L., et al., *Genome features of Leptospira interrogans serovar Copenhageni*. Braz J Med Biol Res, 2004. **37**(4): p. 459-77.
5. Texereau, J., et al., *The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections*. Clin Infect Dis, 2005. **41 Suppl 7**: p. S408-15.
6. Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein. *Microbiology 6th ed*. McGraw-Hil, 2005.
7. Turner, L.H., *Leptospirosis*. Br Med J, 1969. **1**(5638): p. 231-5.
8. Werts, C., *Leptospirosis: a Toll road from B lymphocytes*. Chang Gung Med J, 2010. **33**(6): p. 591-601.
9. Fraga, T.R., A.S. Barbosa, and L. Isaac, *Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system*. Scand J Immunol, 2011. **73**(5): p. 408-19.
10. Levett, P.N., *Leptospirosis*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(2): p. 296-326.
11. Weil, A., *Ueber eine eigentümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende akute Infektionskrankheit*. Arch. Klin. Med., 1886. **30**: p. 209-232.
12. Landouzy, L.T.J., *Fievre bilieuse ou hépatique*, in *Gaz. Hôpital*1883.
13. Ido, Y., et al., *The Rat as a Carrier of Spirochaeta Icterohaemorrhagiae, the Causative Agent of Weil's Disease (Spirochaetosis Icterohaemorrhagica)*. J Exp Med, 1917. **26**(3): p. 341-53.
14. Haake, D.A., *Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis*. Microbiology, 2000. **146 (Pt 7)**: p. 1491-504.
15. Hovind-Hougen, K., *Determination by means of electron microscopy of morphological criteria of value for classification of some spirochetes, in particular treponemes*. Acta Pathol Microbiol Scand Suppl, 1976. **255**: p. 1-41.
16. Charon NW, G.S., *Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes*. Annu Rev Genet, 2002. **36**: p. 37-73.
17. Ellis, W.A. and S.W. Michno, *Bovine leptospirosis: a serological and clinical study*. Vet Rec, 1976. **99**(20): p. 387-91.
18. Faine S., Adler B., Bolin C. Perolat, P. *Leptospira and Leptospirosis 2nd ed*. MediSci. Melbourne, Australia, 1999. p: 272.
19. Ellinghausen, H.C., Jr. and W.G. McCullough, *Nutrition of Leptospira Pomona and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80*. Am J Vet Res, 1965. **26**: p. 45-51.
20. Ellinghausen, H.C., Jr. and W.G. McCullough, *Nutrition of Leptospira Pomona and Growth of 13 Other Serotypes: A Serum-Free Medium Employing Oleic Albumin Complex*. Am J Vet Res, 1965. **26**: p. 39-44.
21. Johnson, R.C. and P. Rogers, *Metabolism of leptospire. II. The action of 8-azaguanine*. Can J Microbiol, 1967. **13**(12): p. 1621-9.

22. Nascimento, A.L., et al., *Comparative genomics of two Leptospira interrogans serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis*. J Bacteriol, 2004. **186**(7): p. 2164-72.
23. Ashford, D.A., et al., *Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua*. Am J Trop Med Hyg, 2000. **63**(5-6): p. 249-54.
24. Bovet, P., et al., *Factors associated with clinical leptospirosis: a population-based case-control study in the Seychelles (Indian Ocean)*. Int J Epidemiol, 1999. **28**(3): p. 583-90.
25. Bharti, A.R., et al., *Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance*. Lancet Infect Dis, 2003. **3**(12): p. 757-71.
26. Thiermann, A.B., *The Norway rat as a selective chronic carrier of Leptospira icterohaemorrhagiae*. J Wildl Dis, 1981. **17**(1): p. 39-43.
27. Vinetz, J.M., et al., *Sporadic urban leptospirosis*. Ann Intern Med, 1996. **125**(10): p. 794-8.
28. Moseley, R.H., *Sepsis-associated cholestasis*. Gastroenterology, 1997. **112**(1): p. 302-6.
29. Vijayachari, P., et al., *A unique strain of Leptospira isolated from a patient with pulmonary haemorrhages in the Andaman Islands: a proposal of serovar portblairi of serogroup Sehgalii*. Epidemiol Infect, 2004. **132**(4): p. 663-73.
30. Wagenaar, J.F., P.J. de Vries, and R.A. Hartskeerl, *Leptospirosis with pulmonary hemorrhage, caused by a new strain of serovar Lai: Langkawi*. J Travel Med, 2004. **11**(6): p. 379-81.
31. Ramachandran, S., et al., *Patterns of acute renal failure in leptospirosis*. J Trop Med Hyg, 1976. **79**(7): p. 158-60.
32. Winearls, C.G., et al., *Acute renal failure due to leptospirosis: clinical features and outcome in six cases*. Q J Med, 1984. **53**(212): p. 487-95.
33. Abdulkader, R.C., *Acute renal failure in leptospirosis*. Ren Fail, 1997. **19**(2): p. 191-8.
34. Daher, E., et al., *Risk factors for death and changing patterns in leptospirosis acute renal failure*. Am J Trop Med Hyg, 1999. **61**(4): p. 630-4.
35. Alani, F.S., et al., *Leptospirosis presenting as atypical pneumonia, respiratory failure and pyogenic meningitis*. J Infect, 1993. **27**(3): p. 281-3.
36. Allen, P., S. Rafferty, and D. Phelan, *Massive pulmonary haemorrhage due to leptospirosis*. Intensive Care Med, 1989. **15**(5): p. 322-4.
37. Chee, H.D., et al., *Adult respiratory distress syndrome in leptospira icterohaemorrhagiae infection*. Intensive Care Med, 1985. **11**(5): p. 254-6.
38. Trevejo, R.T., et al., *Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995*. J Infect Dis, 1998. **178**(5): p. 1457-63.
39. Yersin, C., et al., *Pulmonary haemorrhage as a predominant cause of death in leptospirosis in Seychelles*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000. **94**(1): p. 71-6.
40. Zaki, S.R. and W.J. Shieh, *Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. The Epidemic Working Group at Ministry of Health in Nicaragua*. Lancet, 1996. **347**(9000): p. 535-6.
41. Akashi, S., et al., *Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14*. J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 1035-42.
42. Nahori, M.A., et al., *Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 6022-31.
43. Isogai, E., et al., *Chemiluminescence and phagocytic responses of rat polymorphonuclear neutrophils to leptospire*. Zentralbl Bakteriologie, 1989. **272**(1): p. 36-46.
44. McGrath, H., et al., *Phagocytosis of virulent and avirulent leptospire by guinea-pig and human polymorphonuclear leukocytes in vitro*. Pathology, 1984. **16**(3): p. 243-9.

45. Wang, B., et al., *Interaction of leptospire with human polymorphonuclear neutrophils*. Infect Immun, 1984. **44**(2): p. 459-64.
46. Wang, B., et al., *Role of specific antibody in interaction of leptospire with human monocytes and monocyte-derived macrophages*. Infect Immun, 1984. **46**(3): p. 809-13.
47. Murgia, R., R. Garcia, and M. Cinco, *Leptospire are killed in vitro by both oxygen-dependent and -independent reactions*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 7172-5.
48. Sambri, V., et al., *Comparative in vitro activity of five cathelicidin-derived synthetic peptides against Leptospira, Borrelia and Treponema pallidum*. J Antimicrob Chemother, 2002. **50**(6): p. 895-902.
49. Scocchi, M., D. Romeo, and M. Cinco, *Antimicrobial activity of two bactericins against spirochetes*. Infect Immun, 1993. **61**(7): p. 3081-3.
50. Brinkmann, V. and A. Zychlinsky, *Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?* J Cell Biol, 2012. **198**(5): p. 773-83.
51. Chassin, C., et al., *TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, Leptospira interrogans*. J Immunol, 2009. **183**(4): p. 2669-77.
52. Atzingen, M.V., et al., *Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection*. BMC Microbiol, 2008. **8**: p. 70-86.
53. Barbosa, A.S., et al., *A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin*. Infect Immun, 2006. **74**(11): p. 6356-64.
54. Verma, A., et al., *Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen*. Infect Immun, 2010. **78**(5): p. 2053-9.
55. Lee, K.H., et al., *Virulent Treponema pallidum 47 kDa antigen regulates the expression of cell adhesion molecules and binding of T-lymphocytes to cultured human dermal microvascular endothelial cells*. Yonsei Med J, 2000. **41**(5): p. 623-33.
56. Sellati, T.J., et al., *Outer surface lipoproteins of Borrelia burgdorferi activate vascular endothelium in vitro*. Infect Immun, 1996. **64**(8): p. 3180-7.
57. Boyle, E.C. and B.B. Finlay, *Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(5): p. 633-9.
58. Finlay, B.B. and P. Cossart, *Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens*. Science, 1997. **276**(5313): p. 718-25.
59. Kerr, J.R., *Cell adhesion molecules in the pathogenesis of and host defence against microbial infection*. Mol Pathol, 1999. **52**(4): p. 220-30.
60. Setubal, J.C., et al., *Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 1): p. 113-21.
61. Murray, G.L., et al., *Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with Leptospira interrogans*. Infect Immun, 2009. **77**(3): p. 952-8.
62. Pinne, M. and D.A. Haake, *LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of Leptospira interrogans: presentation of new data and reevaluation of previous studies*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e51025.
63. Ristow, P., et al., *The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence*. PLoS Pathog, 2007. **3**(7): p. e97.
64. King, A.M., et al., *High temperature protein G (HtpG) is an essential virulence factor of Leptospira interrogans*. Infect Immun, 2013. En prensa. doi: 10.1128/IAI.01546-13
65. Cinco, M., *New insights into the pathogenicity of leptospire: evasion of host defences*. New Microbiol, 2010. **33**(4): p. 283-92.

66. Toma, C., et al., *Characteristic features of intracellular pathogenic Leptospira in infected murine macrophages*. Cell Microbiol, 2011. **13**(11): p. 1783-92.
67. Meri, T., et al., *Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires*. Microb Pathog, 2005. **39**(4): p. 139-47.
68. Barbosa, A.S., et al., *Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP*. Infect Immun, 2009. **77**(3): p. 1137-43.
69. Yuri, K., et al., *Chemotaxis of leptospires to hemoglobin in relation to virulence*. Infect Immun, 1993. **61**(5): p. 2270-2.
70. Wagenaar, J.F., et al., *What role do coagulation disorders play in the pathogenesis of leptospirosis?* Trop Med Int Health, 2007. **12**(1): p. 111-22.
71. Ren, S.X., et al., *Unique physiological and pathogenic features of Leptospira interrogans revealed by whole-genome sequencing*. Nature, 2003. **422**(6934): p. 888-93.
72. Haake, D.A.. *Hamster model of leptospirosis*, in *Current Protocols in Microbiology*. John Wiley & Sons, 2006. **Chapter 12**: p. Unit 2:12E.2.1–12E.2.13.
73. Zhang, Y., et al., *Establishment of a leptospirosis model in guinea pigs using an epicutaneous inoculations route*. BMC Infect Dis, 2012. **12**: p. 20-30
74. Matsui, M., et al., *Gene expression profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: comparison between susceptible hamsters and resistant mice*. Infect Immun, 2011. **79**(11): p. 4480-92.
75. Bonilla-Santiago, R. and J.E. Nally. *Rat model of chronic leptospirosis*, in *Current Protocols in Microbiology*. John Wiley & Sons, 2011. **Chapter 12**: p. Unit 12E.3.1–12E.3.8.
76. Pereira, M.M., et al., *Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (Callithrix jacchus): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis*. Am J Trop Med Hyg, 2005. **72**(1): p. 13-20.
77. Martinez, R., et al., *[Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba]*. Rev Panam Salud Publica, 2004. **15**(4): p. 249-55.
78. Koizumi, N. and H. Watanabe, *Leptospirosis vaccines: past, present, and future*. J Postgrad Med, 2005. **51**(3): p. 210-4.
79. Stanchi, N.O., *Leptospiras y Borrelias*. En Microbiología biomédica 2° ed. J.A. Basualdo y R.A. de Torres. Atlante. Buenos Aires, 2006. **Capítulo 45**: p. 502-508.
80. Mora, M., et al., *Reverse vaccinology*. Drug Discov Today, 2003. **8**(10): p. 459-64.
81. Bulach, D.M., et al., *Genome reduction in Leptospira borgpetersenii reflects limited transmission potential*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(39): p. 14560-5.
82. Picardeau, M., et al., *Genome sequence of the saprophyte Leptospira biflexa provides insights into the evolution of Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis*. PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1607.
83. Haake, D.A., et al., *The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection*. Infect Immun, 2000. **68**(4): p. 2276-85.
84. Lima, S.S., et al., *Adhesin activity of Leptospira interrogans lipoprotein identified by in vivo and in vitro shotgun phage display*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **431**(2): p. 342-7.
85. Verma, A., et al., *LruA and LruB, novel lipoproteins of pathogenic Leptospira interrogans associated with equine recurrent uveitis*. Infect Immun, 2005. **73**(11): p. 7259-66.
86. Hartwig, D.D., et al., *Characterization of the immunogenic and antigenic potential of putative lipoproteins from Leptospira interrogans*. Curr Microbiol, 2011. **62**(4): p. 1337-41.

87. Matsunaga, J., et al., *LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 12): p. 3777-86.
88. Gorbach, S.L. and J.G. Bartlett, *Anaerobic infections. 1*. N Engl J Med, 1974. **290**(21): p. 1177-84.
89. Salyers, A.A., *Bacteroides of the human lower intestinal tract*. Annu Rev Microbiol, 1984. **38**: p. 293-313.
90. Ndamukong, I.C., J. Gee, and C.J. Smith, *The extracytoplasmic function sigma factor EcfO protects Bacteroides fragilis against oxidative stress*. J Bacteriol, 2013. **195**(1): p. 145-55.
91. Sund, C.J., et al., *The Bacteroides fragilis transcriptome response to oxygen and H2O2: the role of OxyR and its effect on survival and virulence*. Mol Microbiol, 2008. **67**(1): p. 129-42.
92. Tang, Y.P., M.M. Dallas, and M.H. Malmay, *Characterization of the BatI (Bacteroides aerotolerance) operon in Bacteroides fragilis: isolation of a B. fragilis mutant with reduced aerotolerance and impaired growth in in vivo model systems*. Mol Microbiol, 1999. **32**(1): p. 139-49.
93. Collman, R.W., et al., *Overview of Hemostasia, in Hemostasia and Thrombosis*, in *Basic Principles and Clinical Practice*, R.W. Collman, Editor 2001, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 1-51.
94. Ruggeri, Z.M. and J. Ware, *von Willebrand factor*. FASEB J, 1993. **7**(2): p. 308-16.
95. Colombatti, A., P. Bonaldo, and R. Doliana, *Type A modules: interacting domains found in several non-fibrillar collagens and in other extracellular matrix proteins*. Matrix, 1993. **13**(4): p. 297-306.
96. Edwards, Y.J. and S.J. Perkins, *The protein fold of the von Willebrand factor type A domain is predicted to be similar to the open twisted beta-sheet flanked by alpha-helices found in human ras-p21*. FEBS Lett, 1995. **358**(3): p. 283-6.
97. Whittaker, C.A. and R.O. Hynes, *Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(10): p. 3369-87.
98. Ramos, C.R., et al., *A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide*. Braz J Med Biol Res, 2004. **37**(8): p. 1103-9.
99. Fahnert, B., H. Lilie, and P. Neubauer, *Inclusion bodies: formation and utilisation*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2004. **89**: p. 93-142.
100. Block, H., et al., *Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review*. Methods Enzymol, 2009. **463**: p. 439-73.
101. Stewart, P.E., et al., *Characterization of the Bat proteins in the oxidative stress response of Leptospira biflexa*. BMC Microbiol, 2012. **12**(1): p. 290.
102. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. Immunity, 2010. **33**(5): p. 657-70.
103. Nathan, C., *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(3): p. 173-82.
104. Colotta, F., et al., *Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products*. Blood, 1992. **80**(8): p. 2012-20.
105. Hayashi, F., T.K. Means, and A.D. Luster, *Toll-like receptors stimulate human neutrophil function*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2660-9.

106. Bottazzi, B., et al., *An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm*. *Annu Rev Immunol*, 2010. **28**: p. 157-83.
107. Jaillon, S., et al., *The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps*. *J Exp Med*, 2007. **204**(4): p. 793-804.
108. Lu, J., et al., *Structural recognition and functional activation of FcγR by innate pentraxins*. *Nature*, 2008. **456**(7224): p. 989-92.
109. Cua, D.J. and C.M. Tato, *Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(7): p. 479-89.
110. Pelletier, M., et al., *Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells*. *Blood*, 2010. **115**(2): p. 335-43.
111. Andes, D., et al., *In vivo pharmacodynamics of a new triazole, ravuconazole, in a murine candidiasis model*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**(4): p. 1193-9.
112. Brown, J.M., et al., *Neutrophils contribute to TNF induced myocardial tolerance to ischaemia*. *J Mol Cell Cardiol*, 1992. **24**(5): p. 485-95.
113. Fleming, T.J., M.L. Fleming, and T.R. Malek, *Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family*. *J Immunol*, 1993. **151**(5): p. 2399-408.
114. Andreasen, C. and N.H. Carbonetti, *Role of neutrophils in response to Bordetella pertussis infection in mice*. *Infect Immun*, 2009. **77**(3): p. 1182-8.
115. Brown, C.R., V.A. Blaho, and C.M. Loiacono, *Treatment of mice with the neutrophil-depleting antibody RB6-8C5 results in early development of experimental lyme arthritis via the recruitment of Gr-1- polymorphonuclear leukocyte-like cells*. *Infect Immun*, 2004. **72**(9): p. 4956-65.
116. Egan, C.E., et al., *Understanding the multiple functions of Gr-1(+) cell subpopulations during microbial infection*. *Immunol Res*, 2008. **40**(1): p. 35-48.
117. Nagendra, S. and A.J. Schlueter, *Absence of cross-reactivity between murine Ly-6C and Ly-6G*. *Cytometry A*, 2004. **58**(2): p. 195-200.
118. Daley, J.M., et al., *Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice*. *J Leukoc Biol*, 2008. **83**(1): p. 64-70.
119. Stavnezer, J., *Antibody class switching*. *Adv Immunol*, 1996. **61**: p. 79-146.
120. Sa-Nunes, A., et al., *Gr-1+ cells play an essential role in an experimental model of disseminated histoplasmosis*. *Microbes Infect*, 2007. **9**(12-13): p. 1393-401.
121. Czuprynski, C.J., et al., *Administration of antigranulocyte monoclonal antibody RB6-8C5 prevents expression of acquired resistance to Listeria monocytogenes infection in previously immunized mice*. *Infect Immun*, 1994. **62**(11): p. 5161-3.
122. Leendertse, M., et al., *Neutrophils are essential for rapid clearance of Enterococcus faecium in mice*. *Infect Immun*, 2009. **77**(1): p. 485-91.
123. da Silva, J.B., et al., *Induction of TNF-α and CXCL-2 mRNAs in different organs of mice infected with pathogenic Leptospira*. *Microb Pathog*, 2012. **52**(4): p. 206-16.
124. Keller, C., et al., *Genetically determined susceptibility to tuberculosis in mice causally involves accelerated and enhanced recruitment of granulocytes*. *Infect Immun*, 2006. **74**(7): p. 4295-309.
125. Mestas, J. and C.C. Hughes, *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology*. *J Immunol*, 2004. **172**(5): p. 2731-8.

126. Abbas, A.K., H.J. Burstein, and S.A. Bogen, *Determinants of helper T cell-dependent antibody production*. Semin Immunol, 1993. **5**(6): p. 441-7.
127. Finkelman, F.D., et al., *Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection*. Annu Rev Immunol, 1990. **8**: p. 303-33.
128. Zuerner, R.L., et al., *A Leptospira borgpetersenii serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization*. Clin Vaccine Immunol, 2011. **18**(4): p. 684-91.
129. Romani, L., et al., *An immunoregulatory role for neutrophils in CD4+ T helper subset selection in mice with candidiasis*. J Immunol, 1997. **158**(5): p. 2356-62.
130. Mitsdoerffer, M., et al., *Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(32): p. 14292-7.
131. Kitching, A.R. and S.R. Holdsworth, *The emergence of TH17 cells as effectors of renal injury*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(2): p. 235-8.
132. Doyle, S.L. and L.A. O'Neill, *Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(9): p. 1102-13.
133. Hajjar, A.M., et al., *Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 15-9.
134. Ozinsky, A., et al., *The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13766-71.
135. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
136. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
137. Rehli, M., *Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression*. Trends Immunol, 2002. **23**(8): p. 375-8.
138. Haake, D.A. and J. Matsunaga, *Leptospira: a spirochaete with a hybrid outer membrane*. Mol Microbiol, 2010. **77**(4): p. 805-814.
139. Kurt-Jones, E.A., et al., *Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1860-8.
140. Kabelitz, D., *Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(1): p. 39-45.
141. Haehnel, V., et al., *Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages*. J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5629-37.
142. NCBI. SNPs linked to Gene TLR2. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=7097.
143. Brown, R.A., et al., *R753Q single-nucleotide polymorphism impairs toll-like receptor 2 recognition of hepatitis C virus core and nonstructural 3 proteins*. Transplantation, 2010. **89**(7): p. 811-5.
144. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 675-80.
145. Kirschning, C.J., et al., *Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide*. J Exp Med, 1998. **188**(11): p. 2091-7.

146. Hill, A.V., *The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2001. **2**: p. 373-400.
147. Bochud, P.Y., T.R. Hawn, and A. Aderem, *Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling*. J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3451-4.
148. Kang, T.J. and G.T. Chae, *Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2001. **31**(1): p. 53-8.
149. Ogun, A.C., et al., *The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease*. Eur Respir J, 2004. **23**(2): p. 219-23.
150. Ben-Ali, M., et al., *Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. **11**(3): p. 625-6.
151. Lorenz, E., et al., *A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection*. Infect Immun, 2000. **68**(11): p. 6398-401.
152. Kang, T.J., S.B. Lee, and G.T. Chae, *A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy*. Cytokine, 2002. **20**(2): p. 56-62.
153. Mrabet-Dahbi, S., et al., *The Toll-like receptor 2 R753Q mutation modifies cytokine production and Toll-like receptor expression in atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(4): p. 1013-9.
154. Telleria-Orrriols, J.J., et al., *TLR2-TLR4/CD14 polymorphisms and predisposition to severe invasive infections by Neisseria meningitidis and Streptococcus pneumoniae*. Med Intensiva, 2013. doi: 10.1016/j.medin.2013.08.006.
155. Genomes. *refSNP Cluster Report: rs5743708*. Available from: <http://www.1000genomes.org/home>.
156. Ioana, M., et al., *Different patterns of Toll-like receptor 2 polymorphisms in populations of various ethnic and geographic origins*. Infect Immun, 2012. **80**(5): p. 1917-22.
157. Tsui, F.W., et al., *Toll-like receptor 2 variants are associated with acute reactive arthritis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(11): p. 3436-8.
158. Bustamante, J., et al., *[Toll-like receptor 2 R753Q polymorphisms are associated with an increased risk of infective endocarditis]*. Rev Esp Cardiol, 2011. **64**(11): p. 1056-9.
159. Brown, R.A., J.H. Gralewski, and R.R. Razonable, *The R753Q polymorphism abrogates toll-like receptor 2 signaling in response to human cytomegalovirus*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(9): p. e96-9.
160. Kang, S.H., et al., *Homozygosity for the toll-like receptor 2 R753Q single-nucleotide polymorphism is a risk factor for cytomegalovirus disease after liver transplantation*. J Infect Dis, 2012. **205**(4): p. 639-46.
161. Lee, S.O., et al., *Toll-like receptor 2 polymorphism and Gram-positive bacterial infections after liver transplantation*. Liver Transpl, 2011. **17**(9): p. 1081-8.
162. Xiong, Y., et al., *R753Q polymorphism inhibits Toll-like receptor (TLR) 2 tyrosine phosphorylation, dimerization with TLR6, and recruitment of myeloid differentiation primary response protein 88*. J Biol Chem, 2012. **287**(45): p. 38327-37.
163. McGettrick, A.F. and L.A. O'Neill, *Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(1): p. 20-7.
164. Etokebe, G.E., et al., *Toll-like receptor 2 (P631H) mutant impairs membrane internalization and is a dominant negative allele*. Scand J Immunol, 2010. **71**(5): p. 369-81.

165. Ko, A.I., et al., *Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group*. Lancet, 1999. **354**(9181): p. 820-5.
166. Letunic, I., et al., *SMART 5: domains in the context of genomes and networks*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D257-60.
167. Schultz, J., et al., *SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 5857-64.
168. Punta, M., et al., *The Pfam protein families database*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D290-301.
169. Juncker, A.S., et al., *Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria*. Protein Sci, 2003. **12**(8): p. 1652-62.
170. Nakai, K. and P. Horton, *PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(1): p. 34-6.
171. Nakai, K. and M. Kanehisa, *Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria*. Proteins, 1991. **11**(2): p. 95-110.
172. Nair, R. and B. Rost, *Mimicking cellular sorting improves prediction of subcellular localization*. J Mol Biol, 2005. **348**(1): p. 85-100.
173. Rost, B., G. Yachdav, and J. Liu, *The PredictProtein server*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W321-6.
174. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
175. Vieira, M.L., et al., *A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells*. FEMS Microbiol Lett, 2007. **276**(2): p. 172-80.
176. Romaniuk, M.A., et al., *Human platelets express and are activated by galectin-8*. Biochem J, 2010. **432**(3): p. 535-47.
177. Born, G.V. and M.J. Cross, *The Aggregation of Blood Platelets*. J Physiol, 1963. **168**: p. 178-95.
178. Santos, C.S., et al., *Different outcomes of experimental leptospiral infection in mouse strains with distinct genotypes*. J Med Microbiol, 2010. **59**(Pt 9): p. 1101-6.