

Análisis in silico de las rutas bioquímicas involucradas en la patogenicidad del género *leptospira*

*Dayana M. Hernández Benítez*¹, *Arleth S. López Rivero*²

RESUMEN

El género *Leptospira* está ampliamente distribuido debido a la facilidad con la cual se puede propagar, aspecto que responde condiciones ambientales y socio - económicas. Múltiples estudios han sido dirigidos hacia el conocimiento de diferentes enzimas involucradas en la patogenicidad de especies de *Leptospira*, así como la similitud que algunas de dichas enzimas muestran con otros organismos tales como *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium falciparum* de los cuales se sugiere un ancestro en común. En este trabajo se realizó una búsqueda de las diferentes enzimas utilizando herramientas bibliográficas que permitió la identificación y análisis de las secuencias, así como también el análisis de los rasgos estructurales de las mismas. Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que la ruta bioquímica de la síntesis de terpenoides se encuentra relacionada con la patogenicidad en *Leptospira* y en está es esencial la enzima *LytB*. Lo cual deja un interés en seguir estudiando las diferentes rutas y enzimas que le dan la característica de patógenas a las especies de *Leptospira*

Palabras claves: *Leptospira*, patogenicidad, enzimas, bioinformática, genoma.

1. Estudiante del Programa de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Libre Barranquilla.
Dayanam-hernandezb@unilibre.edu.co
2. Profesora Investigadora del Programa de microbiología, Facultad de ciencias Exactas y Naturales, Universidad Libre Barranquilla

In silico analysis of the biochemical pathways involved in the pathogenicity of the genus leptospira

ABSTRACT

Genus *Leptospira* is present in multiple parts of the world with recurrent outbreaks due to the ease with which it can spread due to environmental and socio-economic conditions, as well as having multiple species of which a large part are pathogenic, infecting animals and also humans. Multiple specialists have dedicated themselves to studying these pathogenic species, leaving as a result the knowledge of different enzymes involved in the pathogenicity of these species, as well as their similarity with other organisms such as *Toxoplasma gondii* and *Leptospira*, of which a common ancestor is suggested. since the FNR are associated with the interrogans plastid class and not bacterial. In this work, a search of the different enzymes was carried out, using bibliographic tools as help that allowed the identification, analysis of enzymes as well as sequences and their structural features. In which it was found that the biochemical route of the synthesis of terpenoids is related to the pathogenicity in *Leptospira* and in this the *LytB* enzyme is essential. Which leaves an interest in continuing to study the different pathways and enzymes that give *leptospira* species the characteristic of pathogens.

Key words: leptospira, pathogenicity, enzymes, bioinformatics, genome

INTRODUCCIÓN

La implementación de herramientas bioinformáticas en la investigación científica es fundamental al momento de buscar rapidez, eficiencia y sobre todo economía. El estudio genómico de microorganismos implica el análisis de múltiples datos, que determinan los modelos experimentales. Las bases de datos, bancos de secuencias genéticas y software específicos, han permitido generar información sin precedente a nivel molecular, que describe estructuras, mecanismo y configuraciones espaciales de moléculas, que han marcado un gran avance en la ciencia.

Un flujo continuo de energía tiene lugar en todos los sistemas vivos. Éste permite sustentar un cúmulo de funciones fisiológicas, de crecimiento, reproducción, movimiento, conservación de estructura y regulación del metabolismo, entre otras. Las reacciones de óxido-reducción (redox) constituyen uno de los mecanismos bioquímicos de mayor importancia en la obtención de energía. El acoplamiento de reacciones redox permite que la energía potencial asociada al contenido y a la posición de los electrones en algunas moléculas, pueda ser aprovechada en la formación de otras moléculas de alta energía (1). Todos estos aspectos determinan los procesos de supervivencia, funcionamiento y adaptabilidad de los organismos vivos a partir de la bioquímica de su estructura.

Un amplio grupo de reacciones de oxido-reducción involucra la actividad catalítica de algunas enzimas que contienen en sus sitios activos especies químicas de naturaleza no proteica llamados cofactores. Las coenzimas son un grupo de cofactores de naturaleza orgánica, que, al estar unidas firmemente a la estructura proteica, reciben el nombre de grupo prostético y permiten el transcurso de reacciones químicas especializadas (2). Para estudiar dichas reacciones, es necesario conocer los rasgos estructurales y catalíticos que permiten el cumplimiento de una función. Aunque la tecnología del ADN recombinante ha facilitado el estudio de dichas enzimas, aplicando técnicas de expresión *in vitro* en células heterólogas, los análisis *in silico* han contribuido enormemente en el entendimiento de las rutas bioquímicas que tienen lugar y las similitudes de los modelos de desarrollo y patogenicidad (si aplica) entre especies.

En el presente estudio se utilizaron modelos de estudio *in silico* para identificar y analizar rutas bioquímicas que posiblemente intervengan en la patogenicidad de un grupo de especies bacterianas del género *Leptospira*.

El objetivo es conocer las rutas bioquímicas que se involucran en la patogenicidad de *Leptospira*, mediante técnicas *in silico*, para identificar las enzimas asociadas a su metabolismo. Para esta finalidad se analizarán las secuencias de aminoácidos que determinan la estructura de las enzimas

identificadas y los rasgos estructurales que las caracterizan.

METODOLOGÍA

El análisis in silico de las rutas bioquímicas seleccionadas, fue realizado mediante la revisión de recursos bioinformáticos y algunas bases de datos disponibles de libre acceso. El procedimiento fue desarrollado en las siguientes etapas:

Etapa 1: Análisis de la información bibliográfica respecto al microorganismo, enzimas y mecanismos de patogenicidad.

Se utilizaron bases de datos tales como Scopus, Science Direct y Pubmed para seleccionar 50 artículos relacionados con el estudio del mecanismo redox de especies del género *Leptospira* patógenas y no patógenas. Fueron tenidos en cuenta solo artículos publicados en revistas indexadas, en idioma inglés y español, priorizando aquellos que no superaran una ventana de publicación de cinco años.

Etapa 2: Selección de enzimas, obtención y análisis de secuencias de interés.

A partir de los trabajos seleccionados, se analizaron rutas relacionadas con la patogenicidad de *Leptospira*. Las rutas fueron obtenidas a partir de KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <https://www.genome.jp > kegg>. Seguidamente fueron seleccionadas enzimas que marcaran diferencias entre

especies de *Leptospira* patógenas y no patógenas, para analizar su homología a través de NCBI, The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.go>), la herramienta Blastp y el Software MEGA X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, and Tamura 2018).

Etapa 3: Análisis de rutas bioquímicas.

Se analizaron las rutas bioquímicas en las cuales se encuentran involucradas las enzimas seleccionadas anteriormente, teniendo en cuenta las formas estructurales que determinan los mecanismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de enzimas asociadas a las rutas bioquímicas involucradas en la patogenicidad del género *leptospira*

La biosíntesis de isoprenoides es esencial para la supervivencia celular. Estas moléculas están implicadas en una amplia variedad de funciones biológicas que son fundamentales en el desarrollo de la célula. En bacterias, la ubiquinona y la menaquinona están involucradas en el transporte de electrones, mientras que los bactoprenoles actúan como portadores de carbohidratos en la biosíntesis del peptidoglicano (3). Teniendo en cuenta la importancia de estos compuestos, se han multiplicado esfuerzos en el conocimiento de las reacciones enzimáticas que intervienen en esta ruta y la naturaleza de sus enzimas como blanco

para el desarrollo de fármacos (4). Existen dos vías independientes a través de las cuales se sintetizan los isoprenoides, la vía clásica del Mevalonato o la vía alternativa 2C- metil- d- eritritol 4-fosfato (MEP/DOXP).

El origen de estas vías ha generado controversia, algunos estudios apoyan la hipótesis de que la vía del Mevalonato es ancestral en arqueas, eucariotas y bacterias, y que probablemente la vía independiente de Mevalonato tiene su origen en eventos de transferencia génica horizontal (5)

La ruta (MEP/DOXP) ha sido identificada en *Plasmodium falciparum*. El complejo de transferencia electrónica Ferredoxina NADP Reductasa (FNR)/Ferredoxina (Fd) ha sido relacionado con el aporte de electrones a LytB en dicha ruta. El primer intermediario de este proceso es la 1-deoxiD-xilulosa-5- fosfato la cual es formada por reacciones de condensación del gliceraldehído-3fosfato y piruvato. Se ha propuesto que la enzima LytB también conocida como IspH, cataliza la última etapa del metabolismo de este intermediario recibiendo un aporte electrónico importante del sistema redox FNR/Fd en este microorganismo (6).

LytB es una enzima que por su alta sensibilidad al oxígeno ha sido relacionada con un posible mecanismo de regulación. Adicionalmente, presenta una alfa-hélice en su secuencia C- terminal que

podría estar involucrada en procesos de represión de la expresión génica (7). En *Thermosynechococcus elongatus*, este tipo de enzimas han sido identificadas dentro de reacciones dependientes de FNR (8). En *Streptococcus pneumoniae* ha sido observado que LytB es fundamental para la división celular neumocócica y la colonización nasal, aunque el mecanismo bioquímico de la acción de esta enzima sigue siendo desconocido(9). El aporte de electrones a LytB por parte de la FNR, ha sido propuesta como blanco para el desarrollo de antibióticos contra la toxoplasmosis y el paludismo, obedeciendo al hecho que el proceso biosintético en general se lleva a cabo en patógenos clínicamente importantes y está ausente en humanos(8)

Análisis realizados en el genoma de algunas especies de *Leptospira*, indican la presencia de la ruta (MEP/DOXP) que se activa en condiciones desfavorables (10). En la figura 1 se observa la ruta de biosíntesis de terpenoides en *Leptospira interrogans* serovar Lai. Esta ruta obtenida para este trabajo a partir de KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <https://www.genome.jp > kegg>, muestra una vía convencional dependiente de Mevalonato para la síntesis de dichos compuestos y una ruta alterna independiente del mismo, con un primer intermediario 1- deoxiD-xilulosa-5-fosfato y una última etapa donde interviene la enzima LytB.

Análisis de secuencias determinantes de la estructura de las enzimas identificadas

Teniendo en cuenta la importancia del prototipo de enzimas LytB/ISPH descrita en el ítem anterior, fueron obtenidas las secuencias disponibles en NCBI, The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para especies de *Leptospira* patógenas. En la tabla 1, se muestran las enzimas seleccionadas con su respectiva clave de acceso.

Las secuencias seleccionadas fueron alineadas con el fin de analizar su similaridad (Figura 2). El único motivo altamente conservado entre las especies estudiadas es la Metionina (M) inicial de cada secuencia. También se destaca un motivo de Leucina (L) en el sitio 282 de las secuencias. Aunque en todas las secuencias se pueden diferenciar seis motivos de Cisteína (C) que son vitales para la formación del centro Fe-S, entre las secuencias no hay homología en los sitios de ubicación de dichos motivos. A pesar que el alineamiento fue construido con enzimas presentes en microorganismos patógenos de *Leptospira*, no se encontró una alta similaridad entre sus secuencias.

Las diferencias encontradas a nivel de secuencia entre las enzimas LytB de *Leptospira*, fueron complementadas con un análisis filogenético simple utilizando el método de máxima parsimonia, involucrando secuencias de LytB de otros patógenos bacterianos importantes. El

árbol más parsimonioso (MP) se obtuvo mediante el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR). En la Figura 3 se puede observar que la secuencia de LytB de *Leptospira interrogans* serovar Lai str.

IPAV es la más alejada del grupo de secuencias analizadas. Adicionalmente se observa un grupo diverso donde las secuencias de dos cepas de la especie *Leptospira borgpetersenii* (JB157 y LB550) son homólogas idénticas. Esta observación también es evidente entre *Leptospira interrogans* serovar Lai str. 56601 y *Leptospira weilii* destacándose entre estas secuencias su cercanía con la secuencia de *Listeria monocytogenes*. También llama la atención la cercanía de la secuencia de *Leptospira interrogans* serovar Linhai con las secuencias de *Vibrio cholerae* y *Streptococcus pneumoniae*.

Estos resultados coinciden con lo sugerido en López Rivero, 2019(11) para *Leptospira interrogans* serovar Lai str. 56601 respecto a la similaridad del modelo catalítico de LytB y otras ferredoxinas de estos microorganismos con microorganismos no bacterianos tales como *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium falciparum*.

ANÁLISIS DE LOS RASGOS ESTRUCTURALES

El único prototipo estructural de LytB conocido hasta el momento es el de *Streptococcus pneumoniae* (14). Inferieron la estructura cristalográfica de esta enzima, logrando distinguir tres dominios

diferenciados, el dominio GH7(15)) que corresponde al dominio catalítico, el dominio SH3B que corresponde a un módulo típicamente bacteriano y la región WW que corresponde a un péptido señal que interviene probablemente en el transporte de la enzima y que está ausente durante el proceso catalítico (Figura 4). Teniendo en cuenta el proceso patogénico de este microorganismo, LytB estaría implicada en la interacción catalítica con receptores de la célula huésped durante el proceso de adhesión/invasión. Es probable que por su capacidad de renovar la envoltura de peptidoglicano (por su acción catalítica dentro de la ruta independiente del Mevalonato) LytB contribuye con la división celular apropiada y la integridad celular. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para definir el mecanismo fisiológico por el cual LytB contribuye a la patogénesis de esta bacteria (15)

En *Leptospiras*, no existe un prototipo estructural de LytB aunque los alineamientos realizados en este trabajo muestran una similaridad con la enzima de *S. pneumoniae*. Sería interesante predecir una estructura hipotética tomando como modelo esta enzima, sin embargo, las estructuras disponibles fueron cristalizadas con el péptido señal unido, atributo que no permitiría una buena superposición de las estructuras. Adicionalmente, se sabe que la expresión recombinante de estas enzimas es de bajo rendimiento, lo que dificulta la generación de cristales y una descripción clara de esta enzima en *Leptospira*. Lo que

sí es claro, es que cualquier alteración a su funcionalidad representa una alternativa de tratamiento para patógenos importantes.

CONCLUSIONES

Con la realización de este análisis in silico se pudo concluir:

- La ruta bioquímica de síntesis de terpenoides está relacionada con la patogenicidad de *Leptospira* y otras bacterias reconocidas
- La enzima LytB es esencial en la vía independiente de Mevalonato en la síntesis de terpenoides en bacterias
- Las secuencias de LytB disponibles para especies patógenas de *Leptospira*, muestran una baja similaridad entre ellas.
- Las secuencias de LytB disponibles para especies patógenas de *Leptospira*, muestran una baja similaridad consecuentes de otros patógenos bacterianos.

RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos, se evidencia la necesidad de continuar con estudios in vivo sobre la importancia de la enzima LytB en la patogenicidad de *Leptospira*.

Es necesario desarrollar protocolos que permitan la obtención de la enzima de manera recombinante y resolver su estructura cristalográfica, de manera de reconocer el modelo estructural y aprovechar sus características para el tratamiento de infecciones con estos microorganismos.

Referencias bibliográficas

1. GHISLA S & MASSEY V. Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions, *Eur. J. Biochem.*,1998, 181(1): 1–17
2. BECKER DF, ZHU W and MOXLEYMA. (2011). Flavin redox switching of protein functions. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14 (6): 1079-1091
3. HEUSTON S, BEGLEY M, GAHANCGM and HILL C. Isoprenoid biosynthesis in bacterial pathogens. *Microbiology (Reading)*. 2012
4. MATSUMI R, ATOMI H, DRIESSENAJ and VAN DER OOST J. Isoprenoid biosynthesis in Archaea--biochemical and evolutionary implications. *Res Microbiol*. 2011
5. LOMBARD J., MOREIRA D. Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. *Mol Biol Evol* 28:87–99). 2011
6. PANDINI V, CAPRINI G., et al. Roles of the species-specific subdomain and the N-terminal peptide of *Toxoplasma gondii* ferredoxin-NADP⁺ reductase in ferredoxin binding. 2006 Mar 21;45(11):3563-71. doi: 10.1021
7. BEINERT H. Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises *Biol Inorg Chem*. 2000 feb;5(1):2-15. doi: 10.1007/s007750050002. Erratum in: *J Biol Inorg Chem* 2000 Jun;5(3): following 408. PMID: 10766431
8. CECCARELLI EA, ARAKAKIAK, CORTEZ N and CARRILLO N. Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases. *Biochim Biophys Acta*. 2004.

9. BAI XH, CHEN HJ, JIANG YL, WEN Z, HUANG Y, CHENG W, LI Q, QI L, ZHANG JR, CHEN Y, and ZHOU CZ. Structure of pneumococcal peptidoglycan hydrolase LytB reveals insights into the bacterial cell wall remodeling and pathogenesis. *J Biol Chem.* 2014 Aug 22;289(34):23403-16
10. CECCARELLI EA, ARAKAKI AK, CORTEZ N and CARRILLO N. Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases. *Biochim Biophys Acta.* 2004.
11. CATALANO-DUPUY DL, MUSUMECI MA, LÓPEZ-RIVERO A and CECCARELLI EA. A highly stable plastidic-type ferredoxin-NADP(H) reductase in the pathogenic bacterium *Leptospira interrogans*. *PLoS One.* 201.
12. ARLETH LOPEZ, ROSSI M., CECCARELLI, y CATALANODUPUY, D.L. a bacterial 2 [4Fe4S] ferredoxin as redox partner of the plastidic-type ferredoxin-NADP+ reductase from *Leptospira interrogans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.* 2019. 1863(4) 651-660
13. BAI XH, CHEN HJ, JIANG YL, WEN Z, HUANG Y, CHENG W, LI Q, QI L, ZHANG JR, CHEN Y, and ZHOU CZ. Structure of pneumococcal peptidoglycan hydrolase LytB reveals insights into the bacterial cell wall remodeling and pathogenesis. *J Biol Chem.* 2014 Aug 22;289(34):23403-16.
14. DE LAS RIVAS B, GARCÍA JL, LÓPEZ R AND GARCÍA P. Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo- beta-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J Bacteriol.* 2002
15. HEUSTON S, BEGLEY M, GAHAN CGM and HILL C. Isoprenoid biosynthesis in bacterial pathogens. *Microbiology (Reading).* 2012 Jun;158(Pt 6):1389-1401. doi:10.1099/mic.0.051599-0. Epub 2012 Mar 30. PMID: 22466083

Anexos

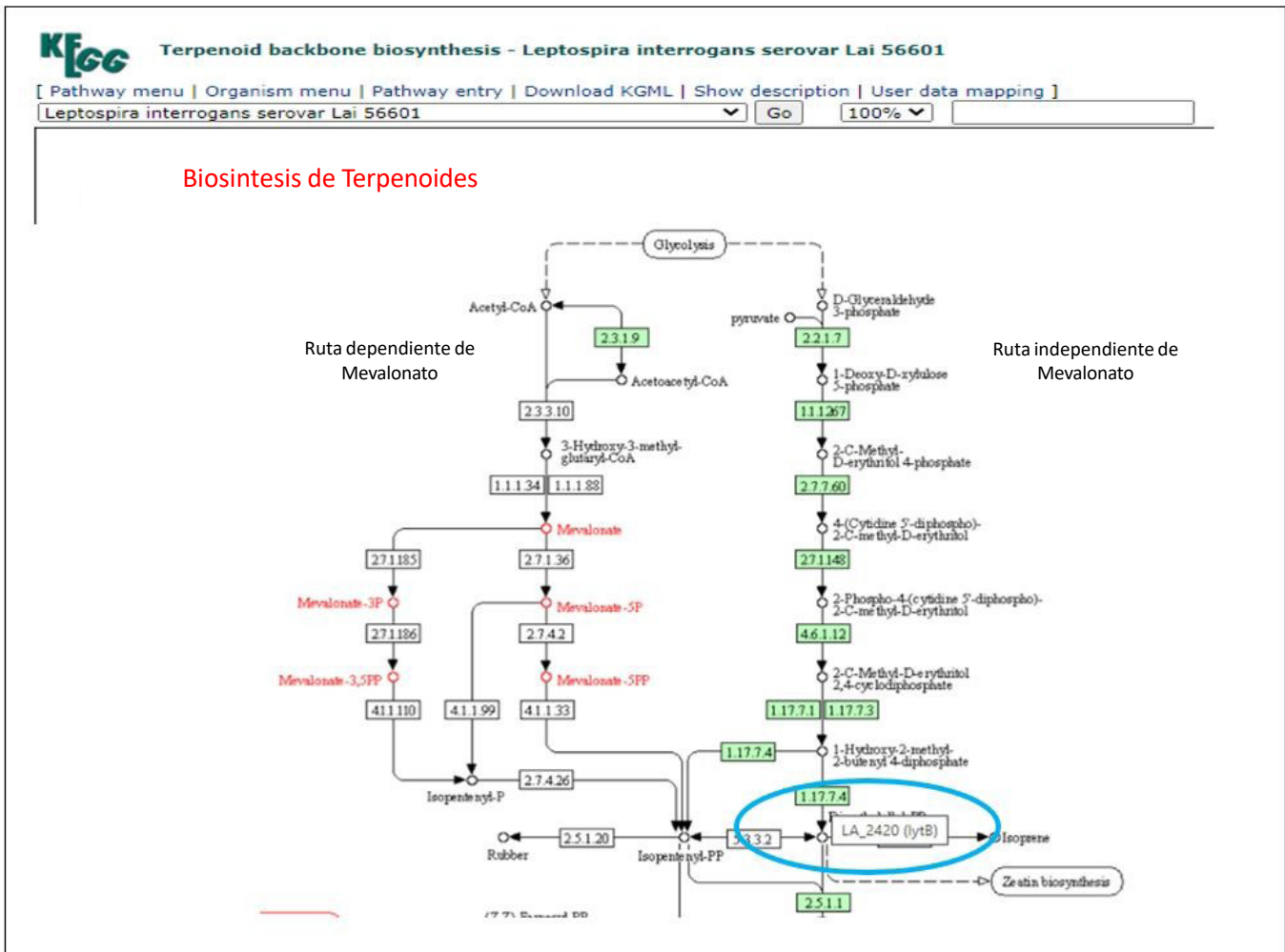
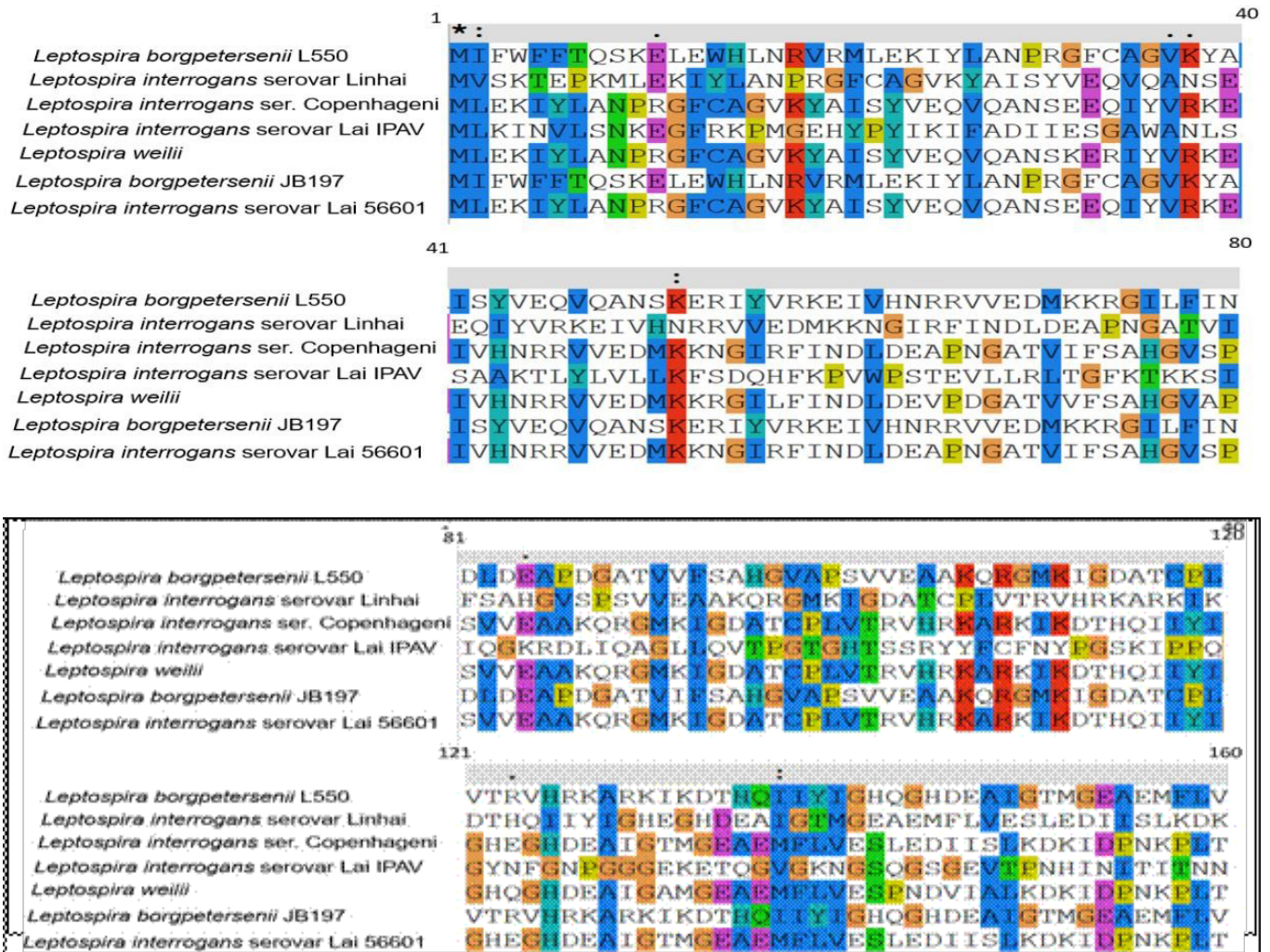


FIGURA 1: Ruta de la biosíntesis de terpenoides en *L. interrogans* serovar Lai. Se observa una ruta dependiente de mevalonato que se activa en condiciones favorables para la bacteria. En condiciones desfavorables se activa la ruta independiente de mevalonato, Se destaca en círculo violeta, el último intermediario LA 2420 (LytB)(15). Analizó la presencia de las vías dependiente e independiente de Mevalonato en bacterias y concluyó que la vía MEP/DOXP es típica de patógenos importantes tales como *Chlamydia pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Helicobacter pylori* entre otros.

MICROORGANISMO	ACCESO	SECUENCIA	TOLERANCIA
<i>Leptospira borgpetersenii</i> L550	LBL_1476	MLEKIYLANPRGFCAGVKYAIISYVEQVQANSEEQIYVRKEVHNRRVVEDMKNKGRIFINDLEAPNGATVIFSAHGVSPSVVEAAKQRMKIGDATCPLVTRVHRKARKIKDTHQIYIGHEGHDEAIGTMGEAEMFLVESLEDISLKDIDPNKPLTYLMQTTLSVADTKNIDQISKTFFVVEHPSKDDICYATTERQEAVSLMMDKIDAMLVIGADNNSNLRLLQLAQKSKPHSFKVSTADDSKEYIQNN EKILGLTAGASTPQVLVDEISKLFYPNANVELFPGSRDSSMNFKLPGLVLS	Penicilina
<i>Leptospira interrogans</i> serovar Linhai	LIL_11650	MVSKTEPKMLEKIYLANPRGFCAGVKYAIISYVEQVQANSEEQIYVRKEVHNRRVVEDMKNKGRIFINDLEAPNGATVIFSAHGVSPSVVEAAKQRMKIGDATCPLVTRVHRKARKIKDTHQIYIGHEGHDEAIGTMGEAEMFLVESLEDISLKDIDPNKPLTYLMQTTLSVADTKNIDQISKTFFVVEHPSKDDICYATTERQEAVSLMMDKIDAMLVIGADNNSNLRLLQLAQKSKPHSFKVSTADDSKEYIQNN EKILGLTAGASTPQVLVDEISKLFYPNANVELFPGSRDSSMNFKLPGLVLS	Penicilina
<i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni	LIC_11529	MILYPKQIRIMVSKMEPKMLEKIYLANPRGFCAGVKYAIISYVEQVQANSEEQIYVRKEVHNRRVVEDMKNKGRIFINDLEAPNGATVIFSAHGVSPSVVEAAKQRMKIGDATCPLVTRVHRKARKIKDTHQIYIGHEGHDEAIGTMGEAEMFLVESLEDISLKDIDPNKPLTYLMQTTLSVADTKNIDQISKTFFVVEHPSKDDICYATTERQEAVSLMMDKIDAMLVIGADNNSNLRLLQLAQKSKPHSFKVSTADDSKEYIQNN EKILGLTAGASTPQVLVDEISKLFYPNANVELFPGSRDSSMNFKLPGLVLS	Penicilina
<i>Leptospira interrogans</i> serovar Lai IPAV	LIF_1981	MLEKIYLANPRGFCAGVKYAIISYVEQVQANSEEQIYVRKEVHNRRVVEDMKNKGRIFINDLEAPNGATVIFSAHGVSPSVVEAAKQRMKIGDATCPLVTRVHRKARKIKDTHQIYIGHEGHDEAIGTMGEAEMFLVESLEDISLKDIDPNKPLTYLMQTTLSVADTKNIDQISKTFFVVEHPSKDDICYATTERQEAVSLMMDKIDAMLVIGADNNSNLRLLQLAQKSKPHSFKVSTADDSKEYIQNN EKILGLTAGASTPQVLVDEISKLFYPNANVELFPGSRDSSMNFKLPGLVLS	Penicilina
<i>Leptospira weilii</i>	FHG68_10880	MLEKIYLANPRGFCAGVKYAIISYVEQVQANSEEQIYVRKEVHNRRVVEDMKNKGRIFINDLEAPNGATVIFSAHGVSPSVVEAAKQRMKIGDATCPLVTRVHRKARKIKDTHQIYIGHEGHDEAIGTMGEAEMFLVESLEDISLKDIDPNKPLTYLMQTTLSVADTKNIDQISKTFFVVEHPSKDDICYATTERQEAVSLMMDKIDAMLVIGADNNSNLRLLQLAQKSKPHSFKVSTADDSKEYIQNN EKILGLTAGASTPQVLVDEISKLFYPNANVELFPGSRDSSMNFKLPGLVLS	No determinada
<i>Leptospira borgpetersenii</i> JB197	LBJ_1807	MIFWFFTSQSKLEWHLNRRVRLMILEKIYLANPRGFCAGVKYAIISYVEQVQANSEEQIYVRKEVHNRRVVEDMKNKGRIFINDLEAPNGATVIFSAHGVSPSVVEAAKQRMKIGDATCPLVTRVHRKARKIKDTHQIYIGHEGHDEAIGTMGEAEMFLVESLEDISLKDIDPNKPLTYLMQTTLSVADTKNIDQISKTFFVVEHPSKDDICYATTERQEAVSLMMDKIDAMLVIGADNNSNLRLLQLAQKSKPHSFKVSTADDSKEYIQNN EKILGLTAGASTPQVLVDEISKLFYPNANVELFPGSRDSSMNFKLPGLVLS	Penicilina
<i>Leptospira interrogans</i> serovar Lai 56601	LA_2420	MLEKIYLANPRGFCAGVKYAIISYVEQVQANSEEQIYVRKEVHNRRVVEDMKNKGRIFINDLEAPNGATVIFSAHGVSPSVVEAAKQRMKIGDATCPLVTRVHRKARKIKDTHQIYIGHEGHDEAIGTMGEAEMFLVESLEDISLKDIDPNKPLTYLMQTTLSVADTKNIDQISKTFFVVEHPSKDDICYATTERQEAVSLMMDKIDAMLVIGADNNSNLRLLQLAQKSKPHSFKVSTADDSKEYIQNN EKILGLTAGASTPQVLVDEISKLFYPNANVELFPGSRDSSMNFKLPGLVLS	Penicilina

Tabla 1. Enzimas seleccionadas: Se muestran las secuencias de enzimas identificadas en el genoma de especies patógenas de *Leptospira*

FIGURA 2



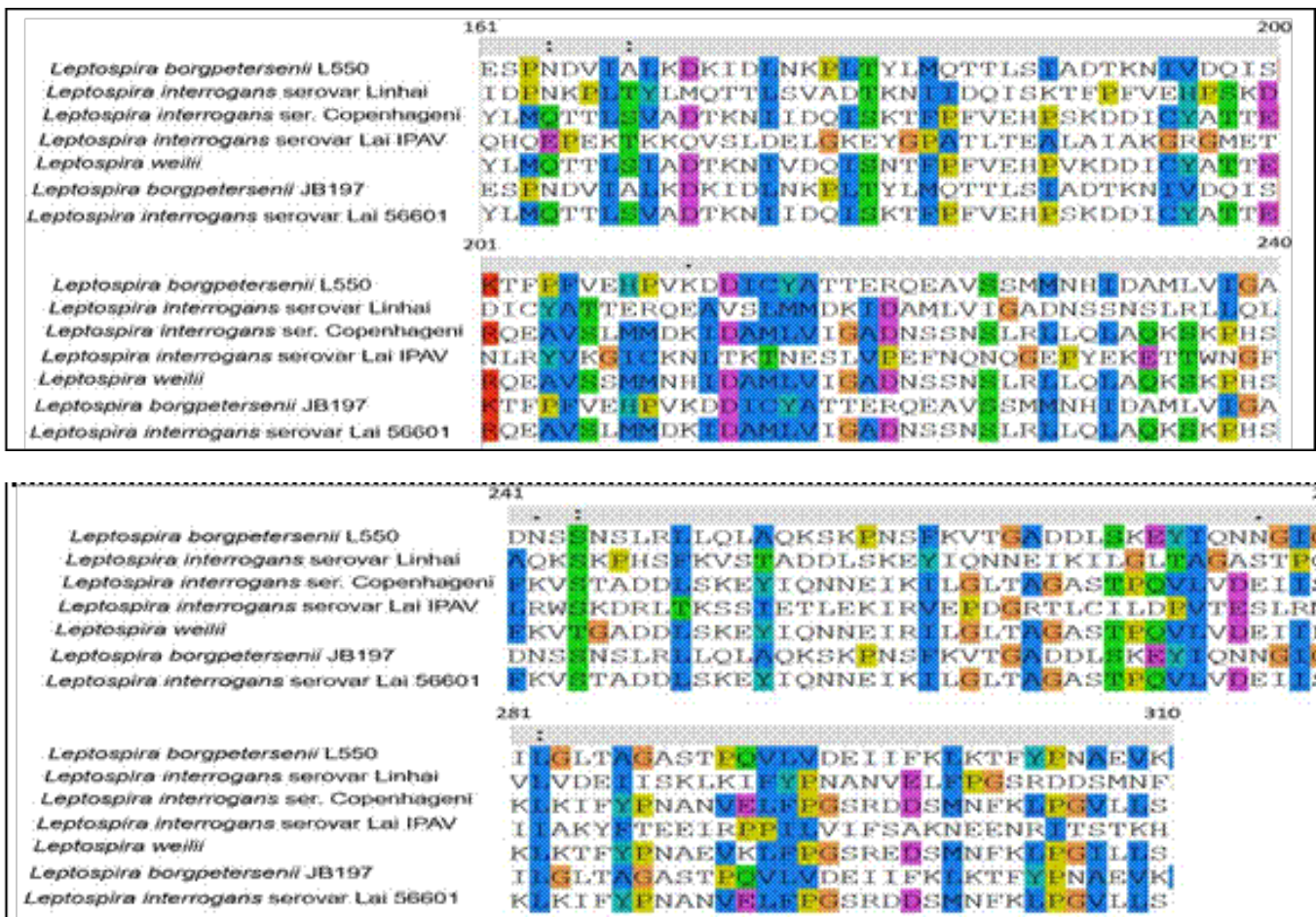


Figura 2. Alineamiento de secuencias de LytB homólogas entre especies patógenas de *Leptospira*. Secuencias obtenidas de NCBI, The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Análisis generado a partir de la herramienta Blastp y el Software CLUSTAL X for multiple sequence alignments Methods Enzymol. Se muestran en color, los aminoácidos que constituyen motivos con mayor similitud entre especie

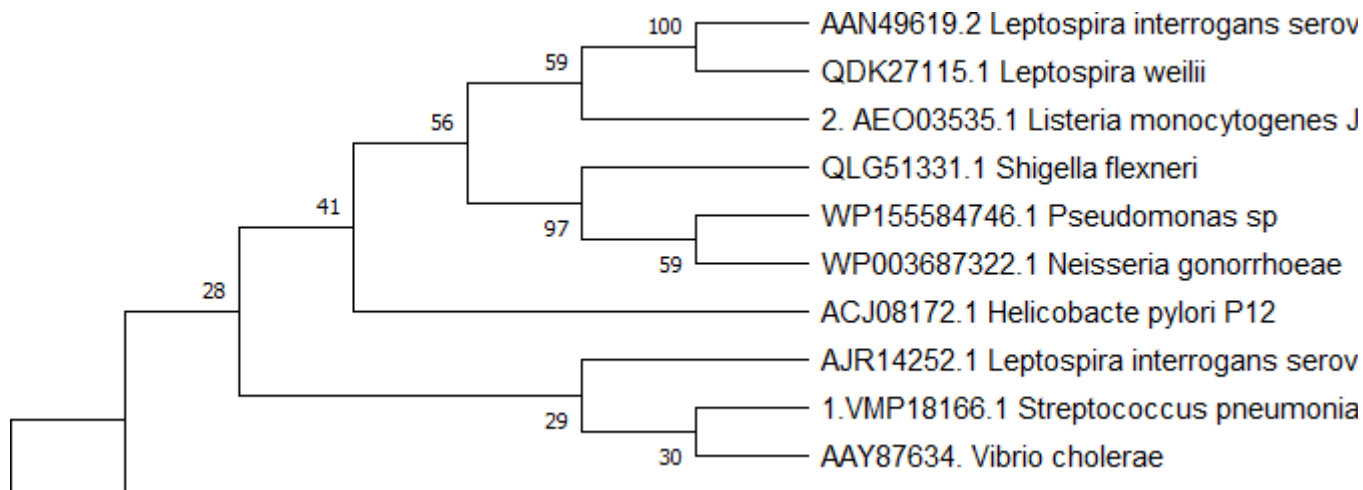


Figura 3. Árbol de máxima parsimonia obtenido mediante el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (Nei M. and Kumar S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.) con nivel de búsqueda 1 en el que la adición de secuencia es aleatoria con 10 repeticiones. Este análisis involucró 13 secuencias de aminoácidos con un total de 344 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en el Software MEGA X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, and Tamura 2018).

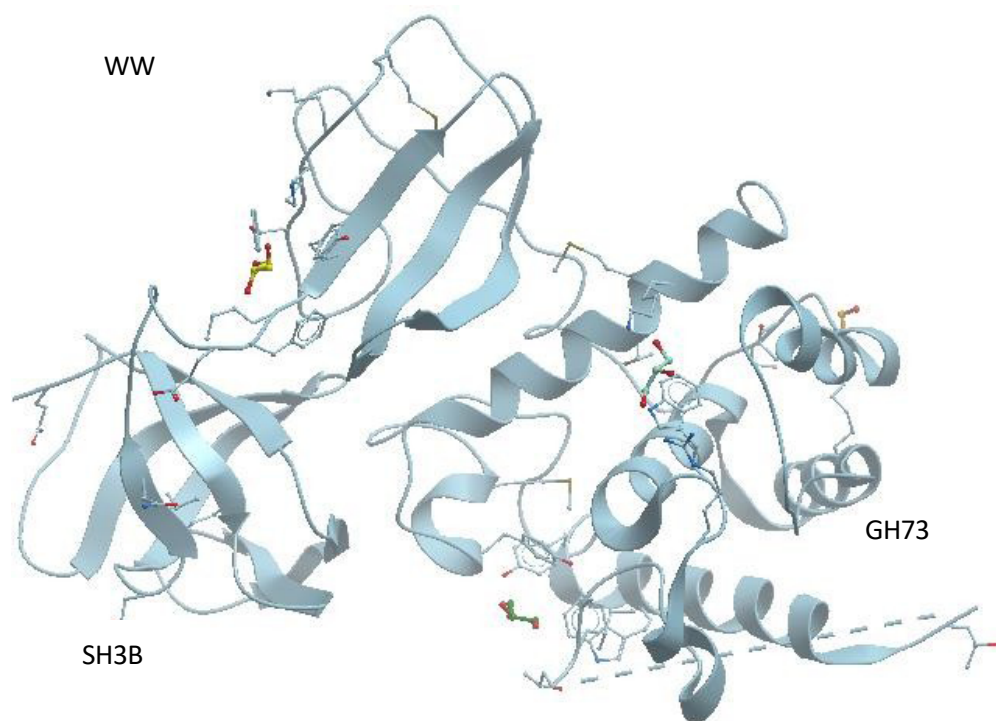


FIGURA 4. Estructura cristalográfica de la enzima LytB de *Streptococcus pneumoniae* (PDB: 4Q2W). SH3B dominio bacteriano, GH73 dominio catalítico y WW péptido señal (Sistema PyMOL Molecular Graphics, Versión 2.0, Schrodinger, LLC).