



FACULTAD DE
CIENCIAS

Microbiología clínica

Grado en Bioquímica
Departamento de Biología Molecular
JMRR-UAM © 2019

UAM

Universidad Autónoma
de Madrid

Tema 12. *NEISSERIA*

Trabajo realizado por:

Paula Gil Cabrerizo
Lucía Huertas Díaz
Antonio García Piqueras
Isabel Alameda Téllez
Carmen Palomino Cano

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	2
1.1. Un poco de historia.	2
1.2. Especies de <i>Neisseria</i>	3
1.2.1. Especies de <i>Neisseria</i> de vida libre.	4
1.2.2. Especies de <i>Neisseria</i> comensales como marcadores de enfermedad.	5
1.3. <i>N. meningitidis</i> :	6
1.3.1. Clasificación:	6
1.4. Epidemiología:	7
1.5. <i>N. gonorrhoeae</i> :	9
2. FACTORES DE VIRULENCIA Y COLONIZACIÓN.	12
3. TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES.	15
4. MECANISMOS DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN <i>NEISSERIA</i>.	24
4.1. Recombinación homóloga intergénica	25
4.2. Mecanismos on/off	27
5. RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA VARIACIÓN GENÉTICA.	30
5.1. Los pili.	30
5.2. Evasión de la respuesta inmunitaria y variación adaptativa.	32
5.3. Tropismos celulares de las proteínas opa (Opa).	35
6. PAPEL DE LOS NEUTRÓFILOS EN LA PATOGÉNESIS DE <i>NEISSERIA</i>	35
7. REFERENCIAS.	45
7.1. <i>Sitios en Internet</i> :	48

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Un poco de historia.

Existen referencias en la **Biblia** y otros escritos antiguos a las infecciones causadas por *N. gonorrhoeae*, pero la primera descripción de un miembro del género *Neisseria* fue en 1879 cuando **Albert Neisser (Figura 1)** observó pequeños diplococcus dentro de células procedentes de exudados uretrales de 26 hombres y mujeres con gonorrea y de individuos con conjuntivitis. Sin embargo, el aislamiento del gonococo solo fue posible una vez que **von Bumm** diseñó el medio específico en 1885.



Figura 1. Albert Ludwig Sigesmund Neisser (Ligon, 2005)

Neisseria meningitidis fue aislada en líquido cefalorraquídeo de pacientes con meningitis por **Weichselbaum** en 1887. Weichselbaum inicialmente denominó la bacteria *Diplococcus intracellularis meningitidis*, reflejando su forma y presencia dentro de las células fagocíticas (**Figura 2**). Sin embargo, posteriormente se reclasificó como *N. meningitidis*.

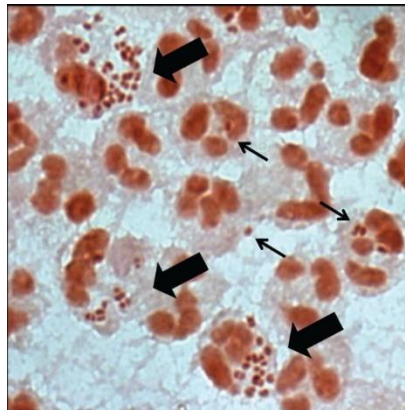


Figura 2. Diplococos de *Neisseria* en células fagocíticas (Johnson & Criss, 2011)

Con la introducción de la **sulfonamida** (1936) y la **penicilina** (1943) en el tratamiento de esta infección se produjo una gran disminución de la incidencia de gonorrea. Sin embargo, en los últimos años se está observando un incremento en la incidencia debido a la emergencia de **bacterias resistentes** a la práctica totalidad de antibióticos. Esto ha llevado al **CDC** (*Centers for Disease Control and Prevention*) de EEUU a designar a los gonococos como **amenaza urgente**

entre los patógenos resistentes a antibióticos.

1.2. Especies de Neisseria

El género *Neisseria* está constituido por **cocos gramnegativos aerobios** con tendencia a agruparse por parejas en forma de grano de café (**Figura 3**). Este género contiene al menos 25 especies con distintas morfologías (**Tabla 1**). Entre las especies de *Neisseria* más conocidas destacan *N. lactamica* y *N. mucosa*, que comparten el tracto nasofaríngeo como nicho y estructuras antigénicas con *N. meningitidis*. De hecho, la presencia de *N. lactamica* se ha relacionado con el desarrollo de **inmunidad protectora** frente a *N. meningitidis*, lo que explicaría el gran número de portadores asintomáticos del meningococo.

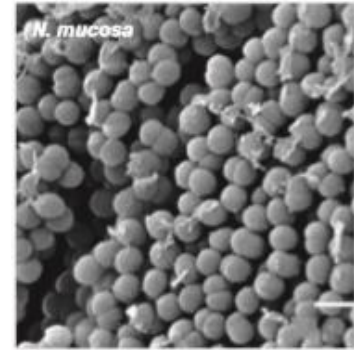


Figura 3. Morfología de grano de café característica del género *Neisseria*. (Liu et al., 2015)

Species	Morphology	Reference
<i>N. weaveri</i>	Bacillus	Andersen et al. (1993)
<i>N. elongata</i>	Bacillus	Bovre & Holten (1970)
<i>N. bacilliformis</i>	Bacillus	Han et al. (2006)
<i>N. shayegani</i>	Bacillus	Wolfgang et al. (2011)
<i>N. animaloris</i>	Coccobacillus	Ganière et al. (1995)
<i>N. zoodegmatidis</i>	Coccobacillus	Ganière et al. (1995)
<i>N. tadorna</i>	Diplococcus	Wang (2011)
<i>N. canis</i>	Diplococcus	Berger (1962)
<i>N. denitrificans</i>	Diplococcus	Berger (1962)
<i>N. animalis</i>	Diplococcus	Berger (1960)
<i>N. dentiae</i>	Diplococcus	Sneath & Barrett (1996)
<i>N. iguanae</i>	Diplococcus	Plowman et al. (1987)
<i>N. wadsworthii</i>	Diplococcus	Wolfgang et al. (2011)
<i>N. macacae</i>	Diplococcus	Vedros et al. (1983)
<i>N. oralis</i>	Diplococcus	Wolfgang et al. (2013)
<i>N. mucosa</i>	Diplococcus	Veron et al. (1959)
<i>N. sicca</i>	Diplococcus	Shaw (1932)
<i>N. flavescens</i>	Diplococcus	Branham (1930)
<i>N. subflava</i>	Diplococcus	Benson et al. (1928)
<i>N. lactamica</i>	Diplococcus	Hollis et al. (1969)
<i>N. polysaccharea</i>	Diplococcus	Riou & Guibourdenche (1987)
<i>N. cinerea</i>	Diplococcus	Knapp et al. (1984)
<i>N. sskuenensis</i>	Coccus	Park et al. (2012)

Tabla 1. Especies del género *Neisseria* (Liu et al., 2015)

De las 11 especies que colonizan a humanos, la mayor parte son **no patogénicas**, aunque algunas pueden causar enfermedad en individuos inmunocomprometidos.

Sin embargo, las dos especies estrechamente relacionadas genéticamente *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* son patógenos globalmente importantes específicos de humanos. Estas especies están especializadas en multiplicarse en las mucosas, pero en distintas localizaciones, y, además,

producen enfermedades muy diferentes.

En concreto, el nivel de similitud de secuencia entre estas dos especies es de **96 %**. Análisis filogenéticos basados en la secuenciación de los genes ribosomales han demostrado que *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* evolucionaron de un **antecesor común** y fue la colonización de distintos nichos ecológicos lo que permitió su separación (**Figura 4**).

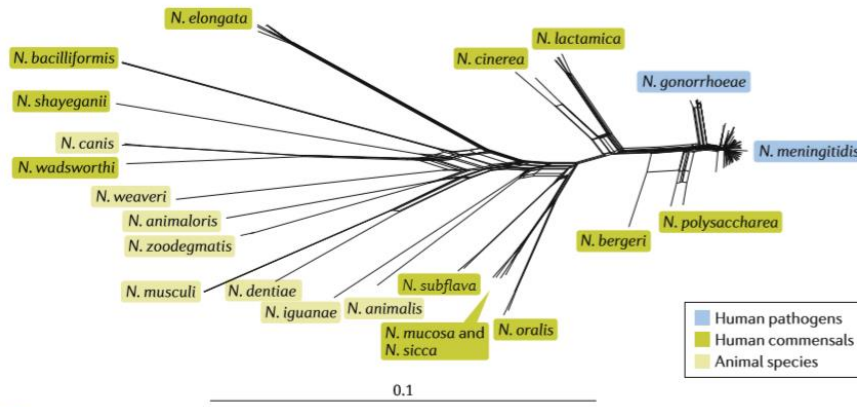


Figura 4. Red filogenética de las relaciones existentes dentro del género *Neisseria* (Rotman & Seifert, 2014)

Mientras que *N. gonorrhoeae* ha sido documentada en **cálculos dentales de Neandertales**, el registro de la enfermedad meningococal es de solamente unas pocas centurias. Análisis genómicos mostraron que una rama del antecesor gonococal adquirió una serie de **factores genéticos** que le permitieron colonizar la superficie de la mucosa oral en lugar de las células urogenitales. Una de las principales diferencias entre *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* es la **falta de cápsula en los gonococos**. De acuerdo a datos de similitud de secuencia, se ha hipotetizado que los genes para la síntesis de la cápsula y otros factores de virulencia en meningococos fueron probablemente adquiridos por **transmisión horizontal** desde miembros de la familia *Pasteurellaceae* después de la separación filogenética.

1.2.1. Especies de *Neisseria* de vida libre.

Algunas especies de *Neisseria* han sido encontradas en el medio ambiente sin una asociación obvia con un hospedador (**Tabla 2**). Algunas de estas especies son capaces de degradar contaminantes orgánicos en diferentes contextos. Por ejemplo, se ha demostrado la existencia de dos cepas que pueden crecer utilizando **benceno** como única fuente de carbono. Además, la especie *Neisseria*

SY22 fue aislada de suelo contaminado por petróleo crudo y se encontró que mostraba una buena capacidad de **biorremediación** contra **petróleo crudo, naftaleno y xileno**.

Isolation site	Species	Method	Reference
Soil	<i>N. sicca</i>	Culture-dependent	Sakai <i>et al.</i> (1996)
Contaminated water, soil and sediment	<i>Neisseria</i>	Culture-dependent	Carrillo-Pérez <i>et al.</i> (2004)
Water and sediment	<i>N. mucosa</i>	Culture-dependent	Thavasi <i>et al.</i> (2007)
	<i>N. sicca</i>		
Oil-polluted soil	<i>Neisseria</i>	Culture-dependent	Xu <i>et al.</i> (2014)
Biofilter packing material	<i>Neisseria</i>	Culture-dependent and -independent	Borin <i>et al.</i> (2006)
Showerhead biofilms	<i>Neisseria</i>	Culture-independent	Feazel <i>et al.</i> (2009)
Mattress dust	<i>N. meningitidis</i>	Culture-independent	Ege <i>et al.</i> (2012)
	<i>N. mucosa</i>		
	<i>N. subflava</i>		
House dust	<i>Neisseria</i>	Culture-independent	Konya <i>et al.</i> (2014)

Tabla 2. Especies comensales reportadas de *Neisseria* (Liu *et al.*, 2015)

1.2.2. Especies de *Neisseria* comensales como marcadores de enfermedad.

Aunque de forma menos virulenta que *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*, las neisserias comensales pueden actuar como patógenos oportunistas en humanos. Aunque *N. polysaccharea* es la especie evolutivamente más relacionada con *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*, hay muchos menos casos de enfermedades causadas por esta especie en comparación con *N. lactamica* y *N. cinerea*.

Aunque la mayoría de las especies de *Neisseria* son comensales **benignos** en la cavidad oral y nasofaríngea de humanos, su presencia y abundancia se han relacionado con el **inicio y progresión de muchas enfermedades**.

-Caries dentales: Dada su abundancia en la cavidad oral, varios estudios han evaluado el papel de las especies de *Neisseria* en las caries dentales revelando una asociación significativa entre *N. flavescens* y un estado oral libre de caries. De hecho, se ha encontrado que la abundancia de especies de *Neisseria* comensales en la cavidad oral se reduce significativamente en fumadores y consumidores frecuentes de alcohol.

-Fibrosis quística: cabe señalar una correlación positiva entre la **disminución de *Neisseria*** en pacientes de fibrosis quística durante la exacerbación aguda.

-Metabolismo lipídico: La abundancia de especies de *Neisseria* en la cavidad oral también parece estar asociada con el metabolismo lipídico humano. De hecho, se relaciona negativamente con los niveles de **lipoproteína de alta densidad y apolipoproteína AI**, que son protectores contra la aterosclerosis. Además, se ha encontrado que *N. mucosa* está presente en cantidades seis

veces mayores entre las personas obesas con respecto a individuos con peso normal.

-Enfermedad inflamatoria intestinal (EII): tiene manifestaciones orales como úlceras y sequedad de boca, sugiriendo una participación de la microbiota oral en la enfermedad. Se ha demostrado un aumento significativo de bacterioidetes en la microbiota salival de pacientes con EII y una reducción concurrente de Proteobacteria, principalmente debidos a la **disminución del transporte de *Neisseria***. Especialmente, la abundancia de *N. mucosa* es **dos veces menor** en pacientes con EII en comparación con controles sanos.

-Cáncer de páncreas: *N. elongata*, junto con *Streptococcus mitis*, se ha demostrado que es significativamente menos abundante en pacientes con cáncer de páncreas que en los controles sanos.

1.3. *N. meningitidis*:

1.3.1. Clasificación:

La clasificación de los meningococos está basada en la reactividad inmunológica y la estructura de la cápsula polisacáridica. Así, encontramos los siguientes serotipos: A, B, C, E-29, H, I, K, L, W-135, X, Y, Z y Z'. Sin embargo, únicamente 6 (A, B, C, W-135, X, Y) causan enfermedades mortales. La identificación del serogrupo se realiza mediante aglutinación o a través de ensayos de PCR.

N. meningitidis es adquirido por la **inhalación** de gotas respiratorias que lo contienen (**Figura 5**). En el **tracto nasofaríngeo**, la bacteria establece un contacto íntimo con las células epidérmicas no ciliadas de las mucosas, donde puede entrar durante un corto espacio de tiempo, volviendo posteriormente a la superficie apical de las células para la transmisión a un nuevo hospedador.

El **estado portador asintomático** es común entre los adultos sanos, en los que las bacterias que cruzan la barrera epitelial van a ser destruidas. Alrededor del 10% de la población europea presenta meningococos como especies comensales. Además de la **transcitosis**, *N. meningitidis* puede atravesar el epitelio a través de **células fagocíticas**, utilizadas por la bacteria a modo de “caballo de Troya”. En individuos susceptibles, una vez atravesada la **barrera epitelial**, la bacteria sobrevive gracias a la presencia de la cápsula polisacáridica que permite inhibir el depósito de opsoninas y la acción de los macrófagos. Finalmente, la bacteria accede a la **sangre** donde se multiplica rápidamente diseminándose a distintos sitios del cuerpo hasta llegar al cerebro.

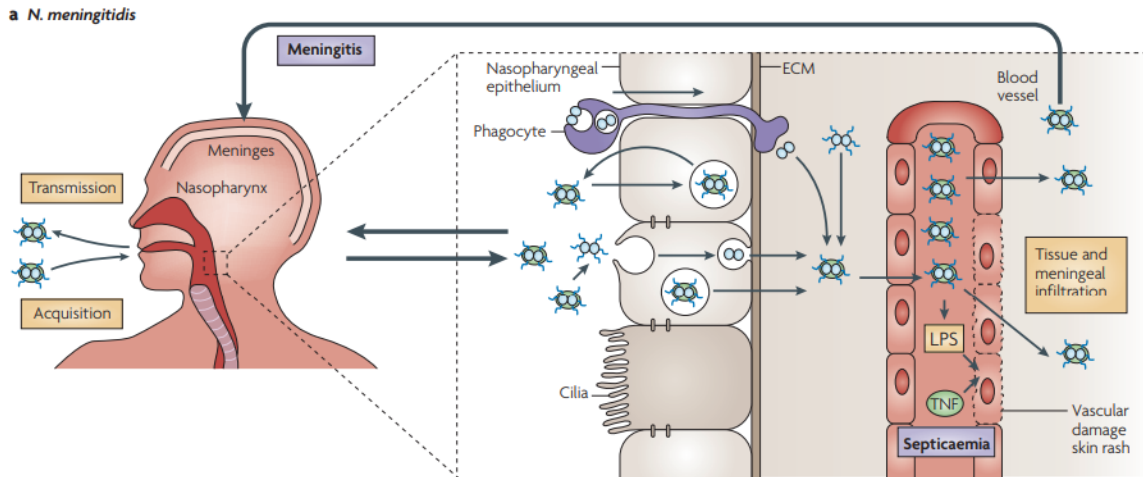


Figura 5. Visión general de la transmisión de *Neisseria meningitidis*, transporte e invasión. (Virji, 2009)

En el torrente sanguíneo, la bacteria puede causar **meningococia** (una bacteriemia sistémica que puede ocasionar un “shock” séptico). Por otro lado, el meningococo tiene capacidad para atravesar la **barrera hematoencefálica** e infectar las **meninges** y el **fluido cerebroespinal** (Figura 6). Si no se produce una intervención a tiempo, la infección puede conducir al desarrollo de **desórdenes neurológicos** y a la **muerte**.

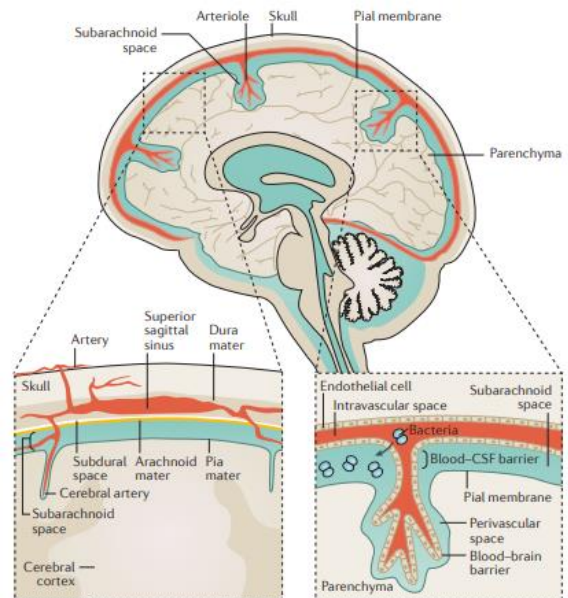


Figura 6. Localización de *N. meningitidis* en el SNC (Beek et al., 2016).

Muy pocos patógenos son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica e invadir las meninges, ya que es una de las barreras más apretadas del cuerpo. *N. meningitidis* alcanza la meta de invadir las meninges utilizando la **ruta transcelular**, estimulando su endocitosis por las células que componen la barrera y su liberación subsiguiente en el fluido cerebroespinal del otro lado.

1.4. Epidemiología:

La **tasa de infección** por *N. meningitidis* es relativamente **baja**, si tenemos en cuenta el

gran porcentaje de individuos que portan la bacteria. Así, en Europa se producen de 1-5 casos de infección por cada 100.000 habitantes.

Es prevalente en **dos grupos de edad**: los niños menores de 1 año y en jóvenes entre 15 y 19 años. Si bien tiene una baja incidencia, la **mortalidad** asociada a la enfermedad es muy **alta**, alrededor del 10% (y del 50% en ausencia de tratamiento); además, en un 20% de los supervivientes quedan algún tipo de **secuela neurológica**.

En concreto, la zona Sur del Sahara, llamada “el cinturón africano de la meningitis” (**Figura 7**), que se extiende desde Senegal hasta Etiopía (abarcando partes o la totalidad de 26 países) tiene la mayor incidencia de enfermedad meningocócica en el mundo. Históricamente, las tasas de incidencia en esa región han superado los 800 casos por cada 100.000 habitantes al año.

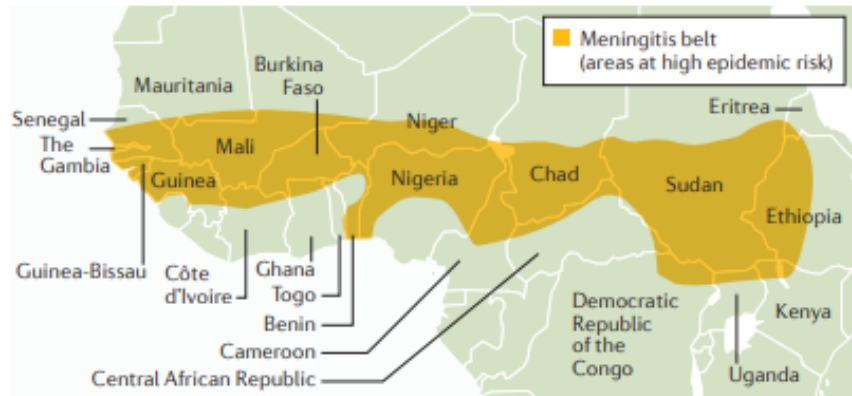


Figura 7. Mapa del "cinturón africano de la meningitis" (Beek et al., 2016).

Si tenemos en cuenta los distintos serogrupos de *N. meningitidis*, la mayoría de los casos de enfermedad meningocócica son causados por 6 serogrupos (A, B, C, Y, W-135 y X) (**Figura 8**). Sin embargo, el programa de vacunación iniciado en 2010 contra esta bacteria ha hecho que la incidencia disminuya.

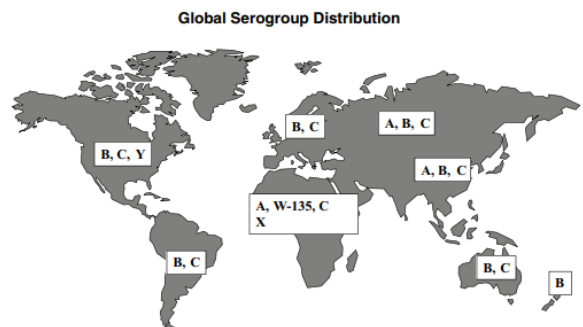


Figura 8. Distribución mundial de la meningitis causada por los diversos serogrupos (Christodoulides 2012)

Dado que *N. meningitidis* se aísla **sólo en humanos y no se encuentra en el ambiente**, parece que su habilidad para causar enfermedad es un **accidente en el ciclo vital**, dado que la muerte rápida de su hospedador no es una ventaja para la bacteria. Como se mencionó antes, el 10% de la

población europea presenta meningococos como especies comensales, pero sólo en contados casos se produce enfermedad.

1.5. *N. gonorrhoeae*:

-Epidemiología:

La gonorrea tiene una incidencia anual de unos 100 millones de casos en todo el mundo. Siendo África y la región occidental del Pacífico donde se dan la gran mayoría de los casos. Además, la expansión de resistencia a antibióticos en muchos aislados está aumentando el temor a que también aumente la incidencia en los países desarrollados (**Figura 9**).

Recientemente, la secuenciación del genoma completo ha permitido estudiar la epidemiología de *N. gonorrhoeae* y la propagación de resistencias. Además, se ha descubierto que a menudo, las infecciones genitales de *N. meningitidis* se diagnostican erróneamente como infecciones por *N. gonorrhoeae* cuando se utilizan ensayos basados en ácidos nucleicos.

En los países en desarrollo, donde la gonorrea tiene una mayor prevalencia, los recursos para la vigilancia de la salud pública son limitados, así como la información sobre infecciones de transmisión sexual, además de que hay grandes obstáculos para acceder a los registros médicos, lo cual puede impedir una evaluación precisa de la carga de la gonorrea en la población.

No obstante, en 2012, la OMS informó de 78 millones de casos de gonorrea en todo el mundo en personas de 15 a 49 años, lo que corresponde aproximadamente a una prevalencia del 0,6% entre los hombres y del 0,8% entre las mujeres. Como se desconoce el número de infecciones asintomáticas y el número de personas que no buscan tratamiento, es probable que el número real de infecciones sea mucho mayor. Se estima que la prevalencia más alta de enfermedades se da en las regiones del Pacífico occidental y África.

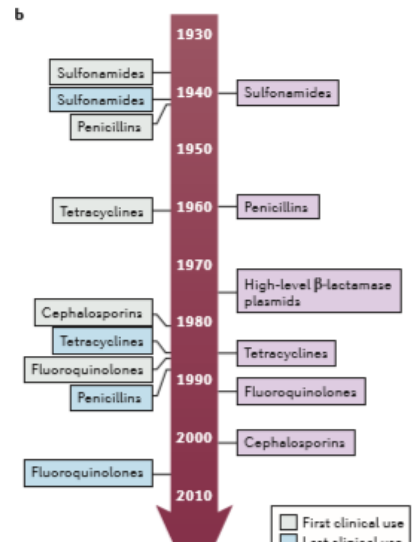


Figura 9. Resistencia a antibióticos de *N. gonorrhoeae* (Quillin & Seifert, 2018)

-Infección:

N. gonorrhoeae es adquirida a través del **contacto sexual**, estableciéndose en las **mucosas del tracto urogenital** y es el causante de la enfermedad de transmisión sexual conocida como **gonorrea (Figura 10)**.

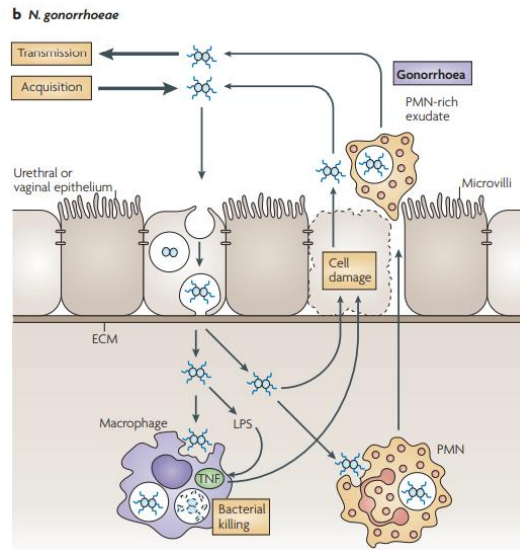


Figura 10. Visión general de la transmisión de *Neisseria gonorrhoeae*, transporte e invasión (Virji, 2009)

Durante la infección inicial (**Figura 11**), *N. gonorrhoeae* se adhiere a las células epiteliales hospedadoras a través de pilis tipo IV que se retraen y permiten interacciones epiteliales con otras superficies prominentes (paso 1). Después de la adhesión inicial, *N. gonorrhoeae* replica y forma microcolonias y posiblemente biofilms (paso 2). Además, compete con la microbiota residente. Mientras coloniza el epitelio, es capaz de invadir y pasar por **transcitosis** hasta la lámina basal. Durante los estadios iniciales de la infección *N. gonorrhoeae* libera fragmentos de peptidoglicano, lipooligosacárido (LOS) y vesículas de membrana externa (Omv) (paso 3) que activan receptores TLR y la oligomerización de las proteínas que contienen dominios NOD, que van a emitir señalización y la activación de factores de transcripción implicados en inflamación (paso 4), desencadenando una **respuesta inflamatoria** basada en la liberación de citoquinas y quimioquinas.

N. gonorrhoeae también libera heptosa-1,7-bisfosfato (HBP), que activa la proteína TIFAA (del inglés, TRAF interacting protein with forkhead associated domain) (paso 5), que interactúa con TRAF. La liberación de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias por estas vías de señalización de la respuesta inmunitaria innata crea gradientes de citoquinas y quimioquinas que reclutan grandes números de **leucocitos polimorfonucleares**, o **neutrófilos**, al sitio de la infección (paso 6), donde interactúan con y fagocitan a *N. gonorrhoeae*. La afluencia de neutrófilos constituye un **exudado purulento** que luego facilita la transmisión (paso 7).

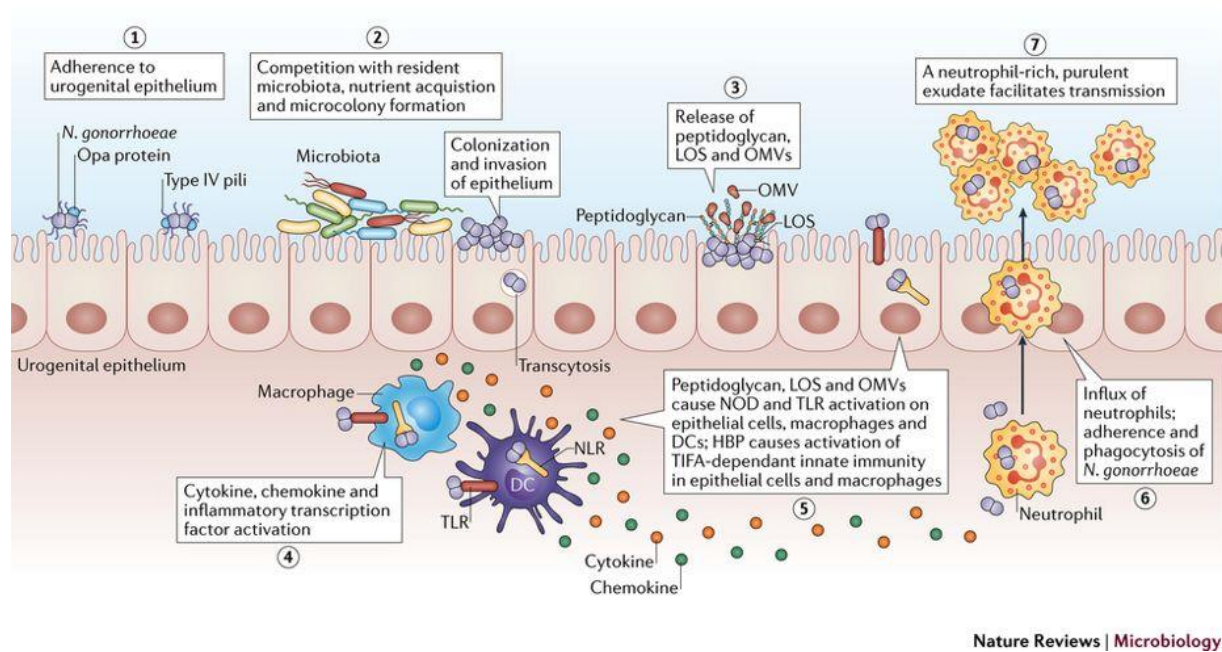


Figura 11. Fases de la infección por *N. gonorrhoeae* (Quillin & Seifert, 2018)

Es la respuesta inflamatoria la causante de las distintas manifestaciones clínicas, que afectan fundamentalmente a los **hombres**, pues en las **mujeres** la infección es frecuentemente **asintomática**. Si bien, en las mujeres, las infecciones pueden producir complicaciones, tales como la **enfermedad inflamatoria pélvica** (PID, “pelvis inflammatory disease”). Como consecuencia de la respuesta inflamatoria frente a la infección se produce un bloqueo en la trompa de Falopio, lo que es causa de **infertilidad** o de desarrollo de **embarazos ectópicos**. También la transmisión materna al niño durante el parto puede ser causa de **ceguera neonatal**.

En casos poco frecuentes, los gonococos pueden llegar a diseminarse a través del torrente sanguíneo, provocando complicaciones tales como **artritis** y **endocarditis**.

Así, estas dos especies son unos típicos **colonizadores de mucosas**. Además, las patogénesis neiserial y gonococal se caracterizan por inducir fuertes respuestas inflamatorias a la infección.

2. FACTORES DE VIRULENCIA Y COLONIZACIÓN.

N. meningitidis se encapsula (se rodea de una cápsula de polisacáridos que la protege del sistema inmunitario, defendiendo a la bacteria del complemento y la fagocitosis). Por otro lado, la cápsula es una estructura muy hidratada, lo que se piensa va a proteger a la bacteria durante la transmisión aérea entre hospedadores. Los gonococos, en cambio, carecen de cápsula polisacáridica (es la única característica estructural que les diferencia), lo que les hace especialmente sensibles a la desecación, lo que explica la necesidad de un contacto íntimo para que se dé la transmisión (**Figura 12**).

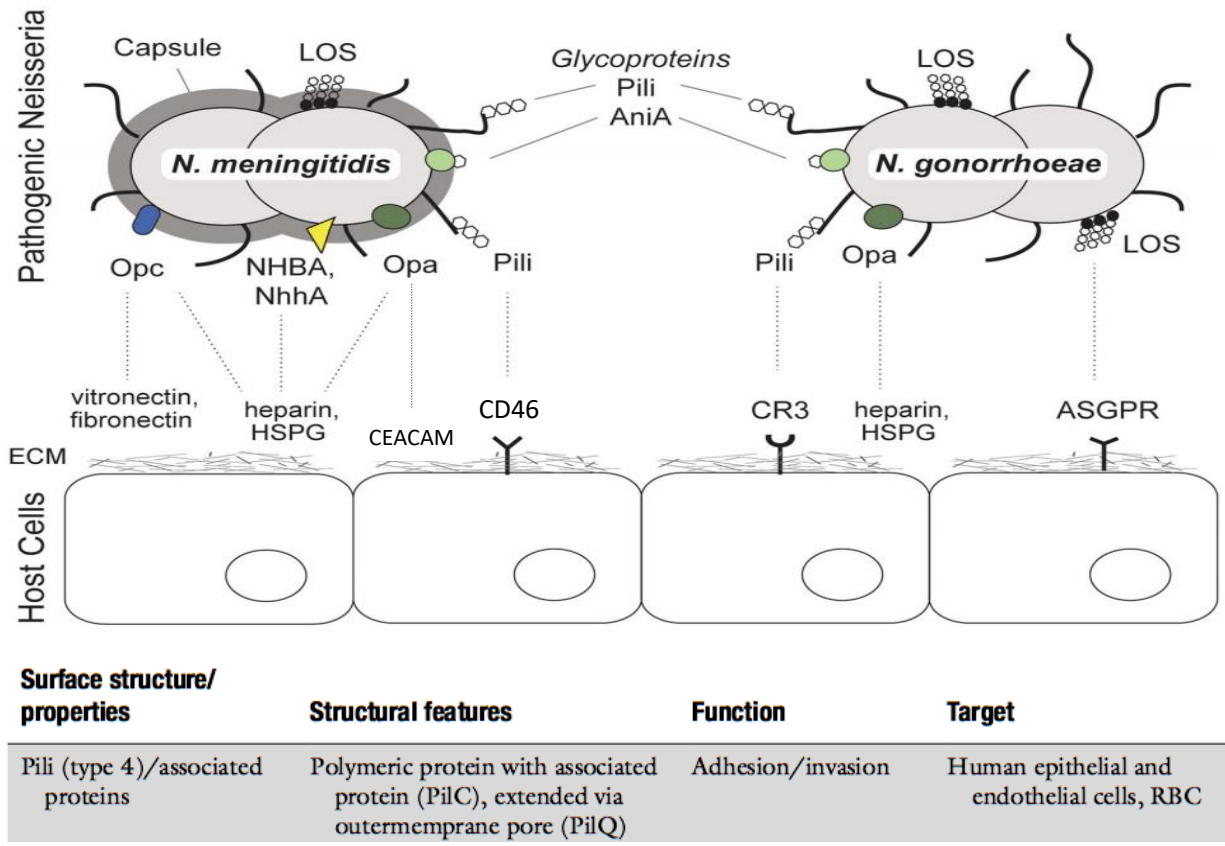


Figura 11. Tropismo de *N.gonorrhoea* y *N.meningitidis*. Figura modificada a partir de la tabla (Virji, 2012) y la figura (Mubaiwa et al., 2017). En esta figura se muestran las interacciones con las células huésped a través de las distintas estructuras de la superficie de Neisseria.

Se han identificado 13 serogrupos diferentes de *N. meningitidis* causantes de la enfermedad, que se clasifican de acuerdo a los polisacáridos que componen la cápsula y su virulencia varía en función de los componentes de la membrana externa. Los principales causantes de enfermedad meningocócica invasiva son los serogrupos A, B, C, W, X e Y. En España, el serogrupo B produce las tasas de incidencia más elevadas, aunque en la última década, el número de casos está disminuyendo, desde la comercialización de la vacuna frente a dicho serogrupo (en 2015). Además, en función de otro tipo de proteínas pertenecientes a la membrana del meningococo se pueden clasificar en serotipos (por porinas), subserotipos (por proteínas Opa) e inmunotipos (por lipooligosacáridos) (**Figura 13**).

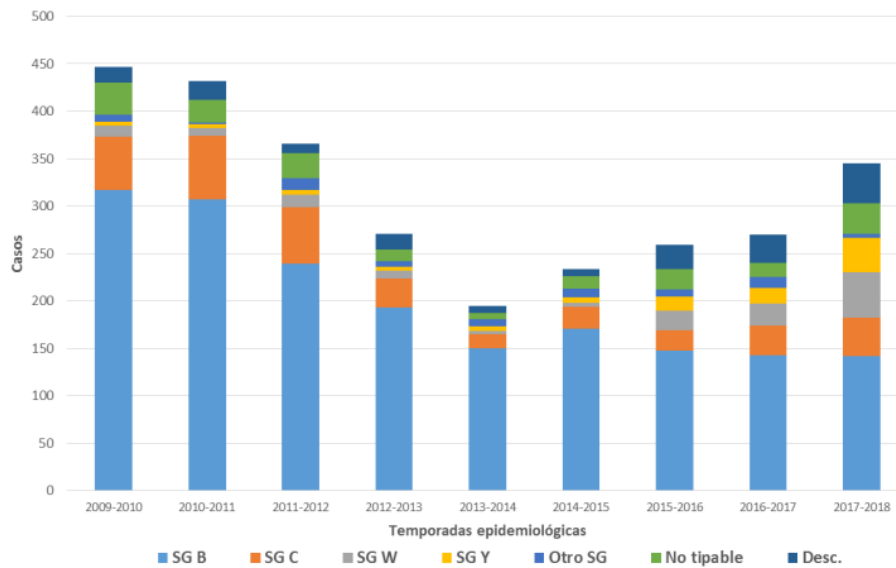


Figura 13.- Enfermedad meningocócica en España: tendencia temporal de los casos declarados según el serogrupo. Temporadas de 2009-2010 a 2017-2018. (Ministerio de Sanidad, 2019)

Para adherirse a las células y tejidos, estas bacterias poseen unas estructuras, denominadas **Pili**, que sobresalen de la cápsula polisacáridica. La formación de pilis es un requisito para el anclaje a la membrana de la célula epitelial. A la adhesión también contribuyen otras proteínas situadas en la membrana externa, que son Opa y Opc. Estas adhesinas parecen ser las responsables de especificidad de hospedador, y de tejido (**Figuras 14 y 15**).

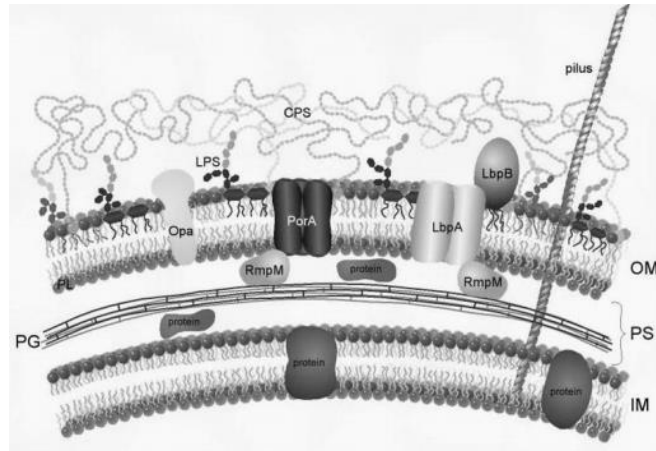


Figura 14.- Superficie celular de los meningococos. Está compuesta por una membrana interna (IM), un espacio periplásmico (PS) y una membrana externa (OM). CPS hace referencia a la cápsula de polisacáridos (De Voer, 2010).

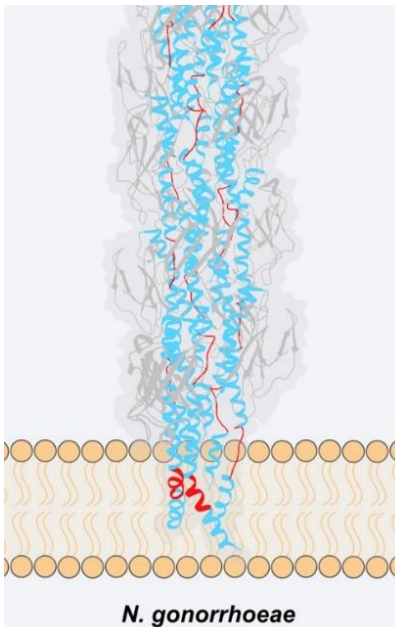


Figura 15.- Reconstrucción microscópica del Pili de *Neisseria gonorrhoeae* (Wang et al, 2017).

Además de para la adhesión, los Pili están implicados en otras funciones. Por un lado, como veremos más adelante, intervienen en la captación de DNA exógeno, aumentando la frecuencia de transformación de la bacteria, lo que contribuye a la diversidad genética de *Neisseria*.

Por otro lado, los Pili son estructuras dinámicas, que se ensamblan y desensamblan de forma rápida, lo que permite a las bacterias deslizarse sobre la superficie celular a la nada despreciable velocidad de 1 micra por segundo. La proteína más abundante que forma los Pili, la pilina E (PilE) es translocada al espacio periplásmico, pero permanece anclada a la membrana por una secuencia hidrofóbica. El ensamblaje del Pili es dependiente de ATP, que se une al complejo de 10 pilinas presente en la membrana interna (PilD, F, G...). Hay otras pilinas que estabilizan la estructura en la membrana externa, las PilQ y PilP. Además, durante los primeros pasos de la biogénesis del Pili, la adhesina (PilC) es incorporada a la punta del filamento (**Figura 16**).

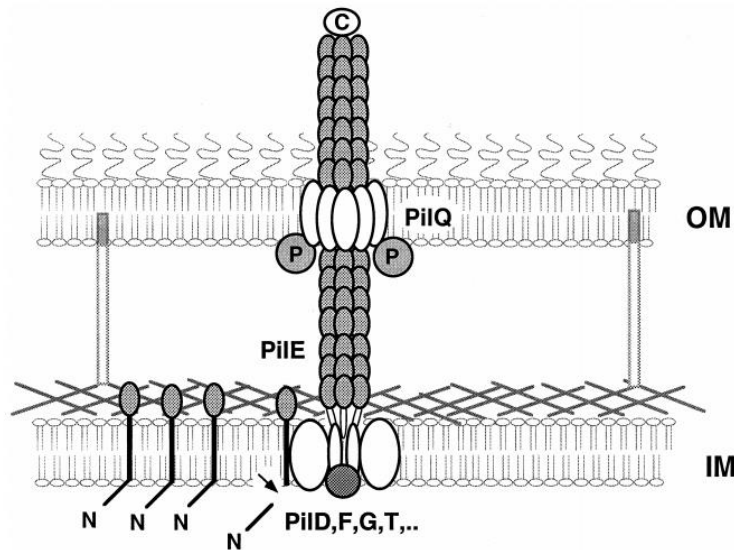


Figura 16.- Estructura del Pili de *N. gonorrhoeae*. Destaca la proteína mayoritaria PilE, y la PilC, que es la adhesina que se encuentra en la punta (Fernández, 2000).

3. TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES.

Parece ser que existe un flujo horizontal continuo de material genético que afecta la composición cromosomal no sólo de las especies *Neisseria* patogénicas, sino también de muchas especies comensales. Análisis al nivel de genes han demostrado la estrecha relación entre gonococos, meningococos y con *Neisseria lactamica*, una especie comensal.

Existe un gran número de evidencias circunstanciales del intercambio horizontal de genes

entre especies comensales y patógenicas de *Neisseria*, entre meningococos y gonococos generando genes mosaico (**Figura 17**).

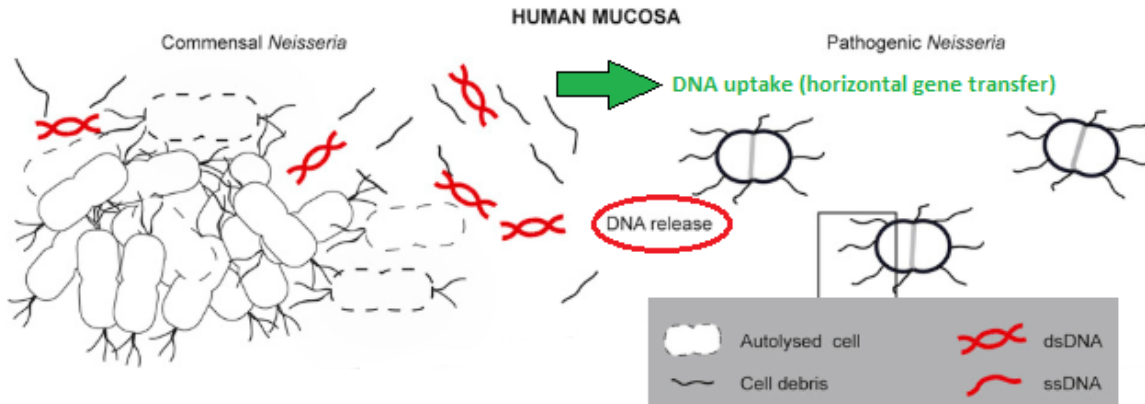


Figura 17.- Transferencia horizontal de genes entre especies comensales y patógenicas de *Neisseria*. Donación de ADN por parte de las bacterias comensales por autólisis y captación mediante Pili de las bacterias patógenicas. Imagen modificada de la original (Jong Kim et al, 2019).

El intercambio genético horizontal puede ser entendido como un mecanismo de adaptación apropiado para responder a cambios ambientales bruscos y para asegurar la flexibilidad genética de las especies de *Neisseria* como un grupo colectivo de aparentemente independientes, pero verdaderamente conectados caracteres (**Figura 18**).

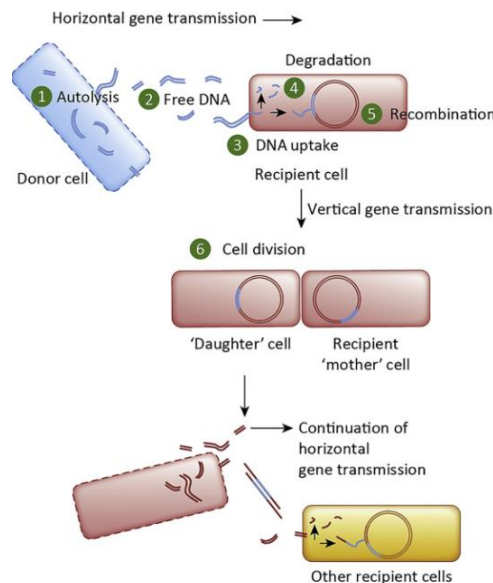


Figura 18.- Esquema del proceso de transferencia horizontal de genes. La donación de ADN (liberación al exterior) en *Neisseria* puede darse por 2 mecanismos: sistema de secreción tipo IV o autólisis (Vos M et al, 2019).

El contraste llamativo entre la clonalidad estricta de *Salmonella* y *E. coli* y la estructura de red clonal de *Neisseria* parece tener reflejo en las diferencias distintivas en la organización cromosomal de los genes de estas especies. El cromosoma de *E. coli* exhibe un grado considerable de organización en cuanto, por ejemplo, el ligamiento de genes relacionados, la presencia de operones y la orientación transcripcional de los genes. Por lo contrario, los mapas físicos de gonococos han revelado que muchos genes funcionalmente relacionados se encuentran distribuidos dispersos en el genoma. Muchos genes que normalmente están organizados en operones en otras especies se encuentran separados en los gonococos.

Hasta ahora, no otros procesos distintos a la transformación han sido encontrados que puedan explicar el intercambio horizontal de los genes cromosomales en *Neisseria*. Bacteriófagos no se han identificado, y aunque existen plásmidos conjugativos que contribuyen a la resistencia a antibióticos, éstos no movilizan secuencias cromosomales.

La habilidad de las especies de *Neisseria* para experimentar transformación de DNA en condiciones naturales se conoce desde hace muchos años.

El intercambio horizontal de marcadores cromosomales vía transformación se observa fácilmente mediante co-cultivo de diferentes cepas de *Neisseria in vitro*. En un experimento típico la eficiencia de transferencia entre dos cepas gonococales después de 1 h de co-cultivo es del orden de 10^{-5} por célula y locus génico.

El proceso es completamente inhibido por la presencia de DNasa en el medio de cultivo lo que indica que hay una liberación sustancial de DNA, accesible a la DNasa, al medio. Cómo el DNA es liberado al medio no ha sido estudiado en detalle; sin embargo, la alta tasa de autólisis espontánea que experimenta *Neisseria* cuando alcanza la fase estacionaria de crecimiento puede ser una explicación.

Resultados recientes apuntan un mecanismo adicional que estaría implicado en el proceso de transformación en gonococos. La mayoría de los aislados de gonococos presentan una agrupación génica (isla de patogenicidad de 57-kb, que presenta un contenido en G+C menor que el promedio del resto del genoma) que codifica para un sistema de secreción tipo IV que parece estar implicado en liberar al medio DNA transformante sin que se produzca lisis celular.

Los sistemas de secreción tipo IV son “nanomáquinas” multiproteicas presentes en diferentes bacterias, que están implicados tanto en esa liberación de ADN al medio, como en la

transformación de ADN dependiente de contacto. Ese sistema en *Neisseria*, está codificado en la isla de patogenicidad GGI (gonococcal genetic island). El cultivo de un donador que tiene mutado alguno de los componentes del sistema de secreción, resulta en una reducción enorme de la liberación de ADN, en comparación del cultivo con una bacteria donadora *wild type* (**Figuras 19, 20 y 21**).

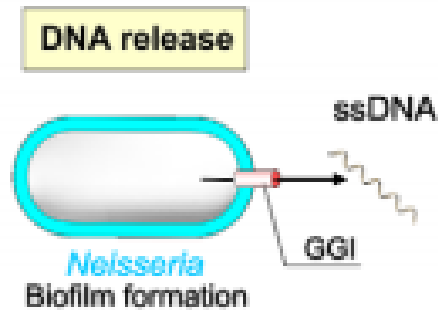


Figura 19.- Representación esquemática del tipo IV de secreción de los gonococos. El sistema (codificado por el GGI- gonococcal genetic island) facilita la liberación del ADN al espacio extracelular (Grohmann et al, 2018).

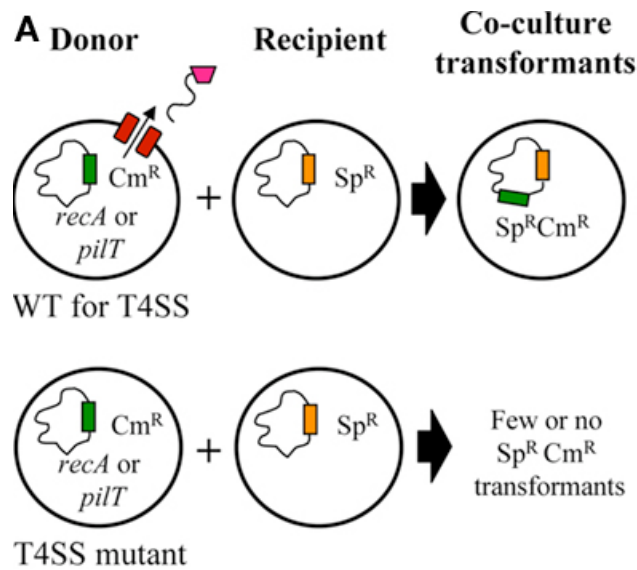


Figura 20.- Ensayo de secreción de ADN con gonococos. En la parte superior de la figura, la bacteria donadora es *wild type*, mientras que en la parte inferior es mutante para alguno de los componentes del T4SS (sistema de secreción tipo 4). El donador porta un marcador de resistencia a cloranfenicol (Cm^R), mientras que el receptor está marcado con resistencia a espicinomicina (Sp^R). El donador porta una mutación en *RecA* para que no pueda actuar como receptor. Tras la

transformación, las bacterias se cultivan en placas con los 2 antibióticos para identificar las transformantes (Ramsey et al, 2011).

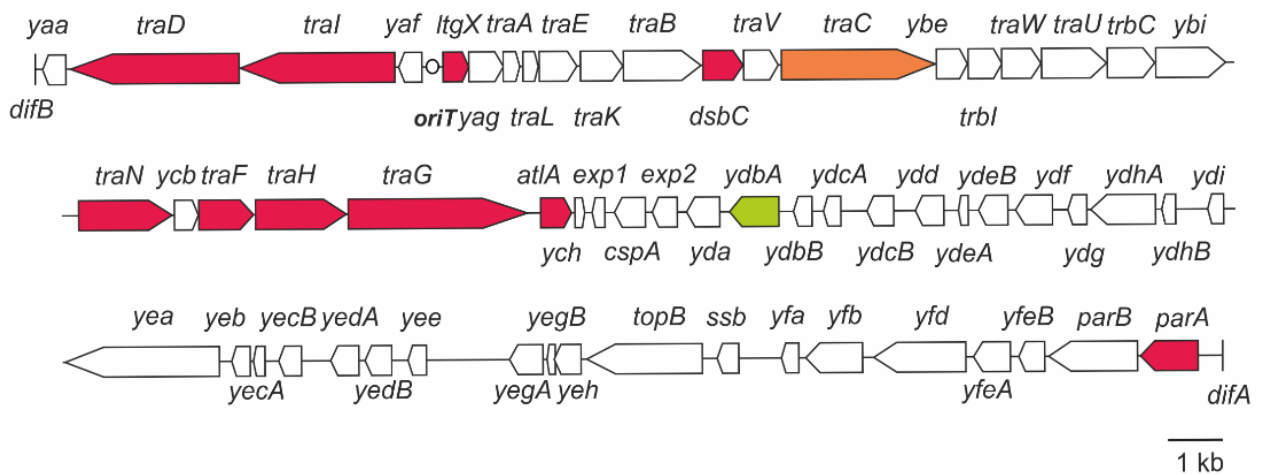


Figura 21.- Representación del mapa de la isla de patogenicidad GGI (gonococal genetic island), que codifica por los componentes del sistema de secreción tipo IV (Pachulec et al, 2014).

En la **Figura 22** se muestra el modelo hipotético sobre el funcionamiento de este sistema de secreción de DNA. Las proteínas ParA y ParB se encargan de llevar DNA cromosomal al sistema de secreción tipo IV. La enzima relaxasa TraI produce roturas en el DNA, y el DNA es desplegado por la helicasa Yea. El DNA de cadena sencilla, unido a la proteína TraI, es secretado al medio extracelular de manera no dependiente de contacto celular. Las transglicosilasas AtlA y Ltx produce roturas locales en el peptidoglicano para permitir que el sistema se ensamble (**Figura 22**).

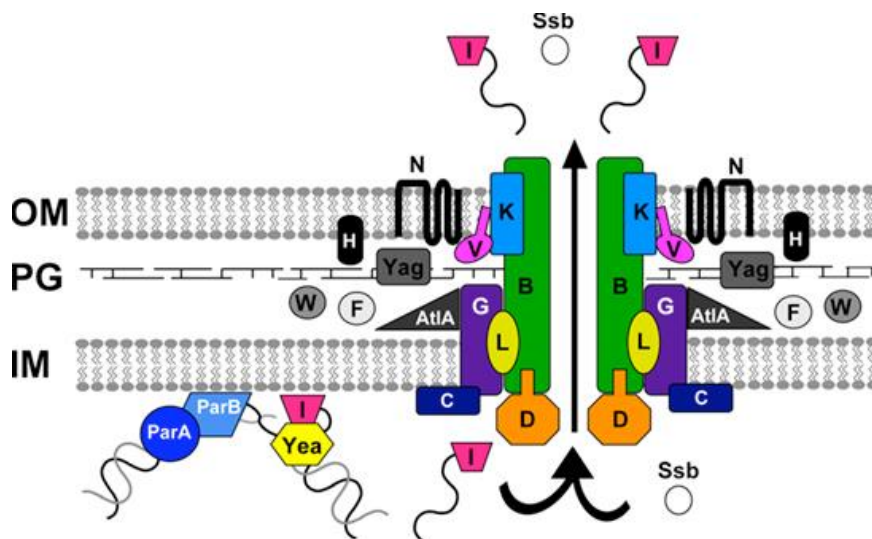


Figura 22.- Modelo de sistema de secreción tipo IV en gonococos. Destacan las proteínas *ParA* y *ParB* que llevan el ADN a dicho sistema; la *Yea* que despliega el ADN y la *TraI*, que se une al ADN por el extremo 5' y permanece unido hasta que sale al medio extracelular. También destacan las proteínas *Tra* (*W*, *F*, *H*) y *AtIA* que rompen el peptidoglicano (*PG*). El aparato transmembrana está formado por las proteínas *Tra* (*B*, *K*, *V*) (Ramsey et al, 2011).

Existen datos que implican a los pilis en la captación e importación del DNA extracelular hacia el interior de la bacteria. También se ha visto que existe una preferencia por captar DNA con secuencias DUS (“DNA uptake signals”, 5'-GCCGTCTGAA-3'). Estas secuencias se encuentran con frecuencia en las regiones de apareamiento de los terminadores transcripcionales Rho independientes. Así, en las 2,15 Mb que componen el genoma de *N. gonorrhoeae* existen 1965 copias de la secuencia DUS, lo que da un promedio de 1 elemento DUS por cada 1096 pb de genoma. Hay variantes de la secuencia DUS de 10 pb (5'-GTCGTCTGAA-3'), presentes más frecuentemente en las especies no patogénicas de *Neisseria* y que tienen una menor eficiencia de transformación. Así, las especies comensales tienen menos copias de la secuencia DUS canónica y poseen una variante. La presencia de estas variantes DUS no canónicas en especies patogénicas es una evidencia de la transferencia horizontal de genes entre especies (**Figura 23**).

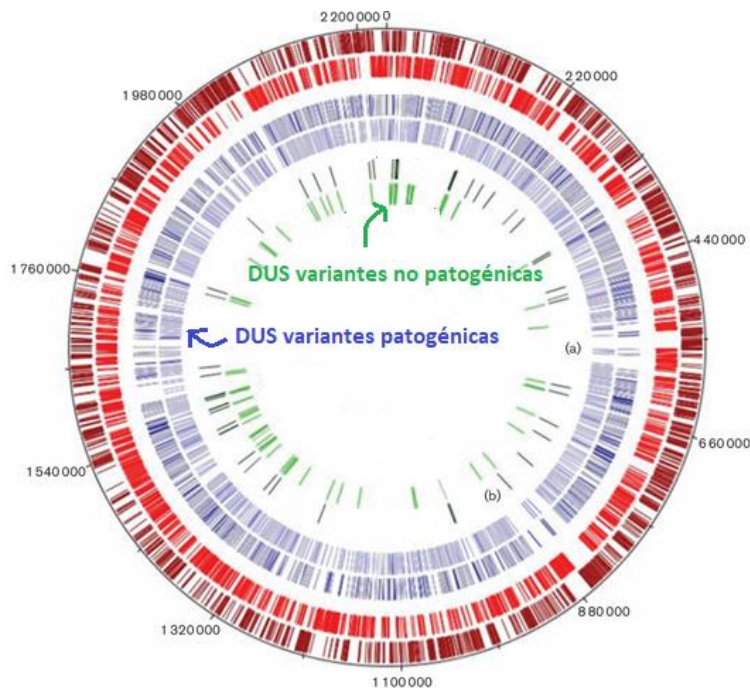


Figura 23.- Mapa circular del genoma de *N. gonorrhoeae*. Se representan las secuencias DUS (DNA uptake sequences) de las variantes no patogénicas (verde) y patogénicas (azul), y en rojo, las secuencias CREE (Correia repeat enclosed elements). Aparece en cada caso, tanto la cadena

positiva (la exterior) y la negativa (la interior). Imagen modificada de la original (Spencer-Smith et al, 2016).

La existencia de una preferencia para captar fragmentos de DNA con secuencia DUS sugiere una preferencia de *Neisseria* por experimentar transformación con DNA de bacterias muy relacionadas.

El proceso de transformación que ocurre entre bacterias del género *Neisseria* tiene varias etapas que se explican a continuación. La primera etapa, donación de DNA, en la mayoría de las especies va a ocurrir mediante autólisis. En el 75% de los aislados de *N. gonorrhoeae* y en el 17% de las cepas meningococales, además, la donación de DNA puede ser mediada por el sistema de secreción tipo IV presente en una isla de patogenicidad.

La autólisis parece ocurrir principalmente durante la fase estacionaria de crecimiento o en condiciones de estrés celular (falta de nutrientes, temperatura no óptima, etc.). La principal autolisina caracterizada in vitro es una N-acetilmuramil-L-alanina amidasa, que es responsable de la hidrólisis del peptidoglicano.

La segunda etapa, unión del DNA y entrada, es dependiente de los Pili tipo IV. Hasta el momento, se han implicado a diversas proteínas constituyentes del Pili así como otras proteínas asociadas (**Figura 24**). Así, ComP y PilV parecen estar implicadas en la unión a DNAs con secuencias DUS. Una vez atravesada la membrana externa, ComE se une al DNA y ayuda a la transformación, mientras que Tpc y ComL parecen ayudar a que el DNA cruce la capa de peptidoglicano. PilT y ComA, finalmente, parecen las encargadas de ayudar al DNA para que cruce la membrana interna y acceda al citoplasma.

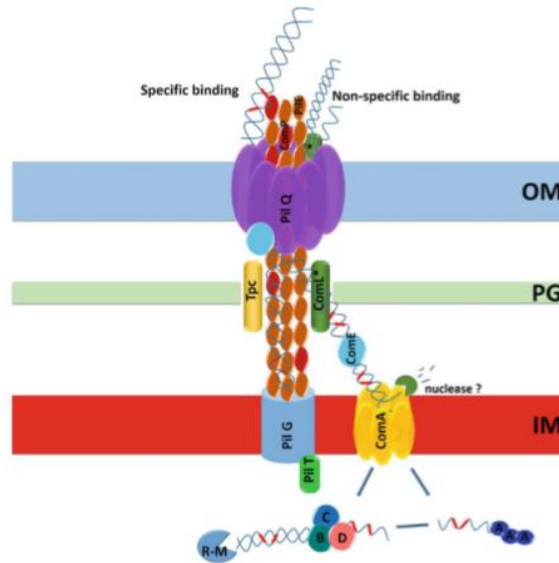


Figura 24. Captación de DNA dependiente de los Pili tipo IV en *Neisseria*. Se indica el proceso de captación, así como la localización de las diferentes proteínas que intervienen en la membrana extracelular (OM), membrana intracelular (IM) y en la capa de peptidoglicanos (PG) (Sánchez et al, 2019).

Una vez en el citoplasma, el DNA debe ser procesado (tercera etapa). *N. gonorrhoeae* contiene unas 16 metiltransferasas, muchas de las cuales tienen sus correspondientes endonucleasas que, en conjunto, constituyen una magnífica barrera de restricción frente a plásmidos transformantes. Esto ha llevado a plantear que mucho del DNA adquirido en este proceso ha debido ser convertido a ssDNA en el periplasma, lo que lo hace resistente a las endonucleasas. Cuando el DNA que entra es dsDNA, este es modificado mediante sistemas de modificación por restricción (RM) y por recBCD.

Por otro lado, *N. meningitidis* es capaz de restringir la transformación por DNA mediante un sistema CRISPR/Cas (no existente en los aislados de gonococos). Pequeñas secuencias palindrómicas agrupadas en locus (CRISPR, *clustered, regularly interspaced, short palindromic repeat*) separadas por espaciadores que pueden ser de origen bacteriófago o plasmídico, actúan como sistema de inmunidad basado en la habilidad de la nucleasa Cas (*CRISPR-associated*) para degradar DNAs entrantes que contengan alguna de las secuencias del locus CRISPR.

Este sistema, además de proteger a la bacteria frente a fagos invasores o plásmidos conjugativos, es utilizado para defenderse frente a DNA transformante (**Figura 25**). Hay tres etapas de la vía de interferencia CRISPR-Cas:

- Etapa de adaptación. Al entrar en las células, se incorporan pequeños fragmentos de los ADN invasores como nuevos espaciadores en el sistema CRISPR del cromosoma huésped.
- Etapa de biogénesis del crRNA. Los pre-crRNAs son producidos por transcripción a través del sistema CRISPR, y luego procesados en crRNAs maduros y cortos, cada uno con secuencias derivadas de un solo espaciador y repetición(es) de flanco.
- Etapa de interferencia del blanco. Los crRNAs se ensamblan con las proteínas Cas en complejos efectores, y sirven como guías antisentido para que los complejos efectores localicen y destruyan.

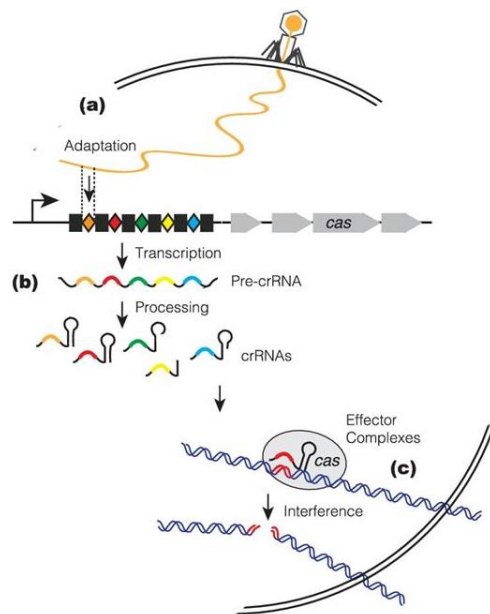


Figura 25. Etapas de la vía de interferencia CRISPR/Cas en *Neisseria*. Los cuadrados negros se corresponden con los loci CRISPR, los rombos de colores con las secuencias espaciadoras y las flechas grises con los genes Cas asociados a CRISPR (Zhang, 2017).

Finalmente, el ssDNA, generado tras la acción de varias nucleasas, se une a RecA, que va a mediar la recombinación homóloga con secuencias cromosomales. La proteína RecA se encarga de buscar la secuencia complementaria en el cromosoma bacteriano.

Además de ayudar a generar variabilidad antigénica en las proteínas de superficie, la

transformación también sirve para expandir la resistencia a antibióticos entre los miembros de la población.

4. MECANISMOS DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN *NEISSERIA*.

La variabilidad antigénica es una estrategia muy efectiva, utilizada por muchos patógenos, para evadir la respuesta inmunitaria.

Así, la variabilidad de las estructuras expuestas en la superficie (**Figura 26**) permite una heterogeneidad antigénica en la población de microorganismos, lo que permite que algunos de ellos puedan evitar el reconocimiento por la respuesta inmunitaria adaptativa y así prolongar su presencia en el hospedador. Por otro lado, esta variación también puede generar variantes funcionales en las proteínas de superficie con una mejor capacidad para establecer interacciones con moléculas del hospedador y facilitar la expansión del agente infeccioso.

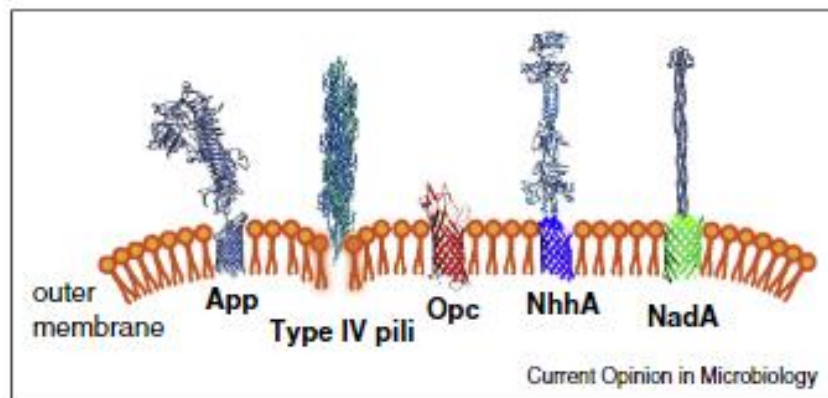


Figura 26. Ilustración esquemática de las proteínas de la membrana externa de *Neisseria*. App (Proteína de adhesión y penetración); Pili tipo IV; Opc (Proteína de opacidad C); NhhA (Homóloga de *Neisseria hia/hsf*); NadA (Adhesina A de *Neisseria*) (Pizza, Rappuoli., 2015).

Una característica interesante de algunas de las proteínas variables de superficie en *Neisseria* es que están representadas en el genoma por familias más que por genes individuales.

Dos mecanismos por los que estas proteínas varían sus estructuras pueden ser distinguidos basados sobre si o no el proceso de variación requiere de la proteína RecA.

4.1. Recombinación homóloga intergénica

El ejemplo mejor conocido de variación dependiente de RecA lo representa la subunidad mayoritaria de los pili, PilE o pilina, que opera mediante recombinación homóloga intergénica. En el genoma existen muchas copias génicas, de las cuales muchas son copias génicas incompletas (silentes/crípicas) no-expresadas (pilS), mientras sólo una o dos de éstas representan las copias génicas expresadas (pilE). En cuanto a su organización genómica, tanto pilE como pilS cuentan con regiones constantes y variables: las regiones semivariables (SV), un bucle hipervariable (HVL) y una cola hipervariable (HVT) son regiones de heterología entre el gen pilE y las copias de pilS, mientras que cys1 y cys2 son secuencias conservadas entre todas las copias de pilina (**Figura 27**).

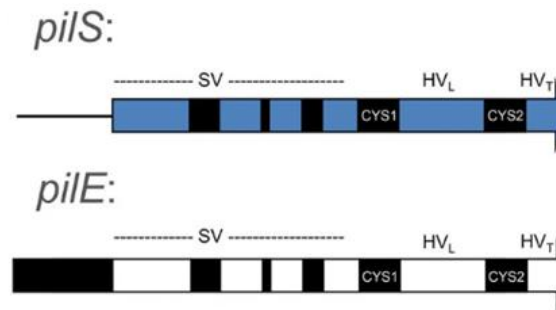


Figura 27. Organización de los genes *Pilina* en *Neisseria*. Se observan las regiones semivariables (SV), de bucle hipervariable (HVL) y de cola hipervariable (HVT), además de las secuencias conservadas *cys1* y *cys2* (Rotman et al, 2016).

Las copias pilS se encuentran en muchos sitios del cromosoma. Las copias silentes carecen de región promotora, sitio de unión a ribosomas y, además, carecen de la secuencia codificante para la región N-terminal. Estas copias comienzan con información codante por debajo de codón 30 o más abajo; sin embargo, en el extremo 3' todas las copias están completas.

Las copias pilS constituyen el repertorio de secuencias variantes que es empleado para la recombinación con pilE para generar moléculas variantes de pilina.

La recombinación de los genes *pil* parece ocurrir por recombinación no recíproca (semejante a la conversión génica). La secuencia variante del gen silente se duplica y transpone al gen en expresión, reemplazando a la secuencia original presente en el gen en expresión, que se pierde (**Figura 28**). Este proceso depende de *recA* y del motivo cuádruple de Guanina (G4) bajo el promotor de un RNA pequeño no codificante (sRNA), upstream del promotor de pilE (**Figura 29**). En cuanto al mecanismo de variación antigénica en *Neisseria*, la iniciación de la variación

antigénica ocurre con la transcripción del sRNA no codificante. El proceso de transcripción desenrolla el dsDNA y posteriormente se produce la oclusión de la hebra rica en C por la formación de un intermediario ADN-ARN, lo que permite la formación del motivo G4. La energía de activación requerida para la formación de G4 puede ser reducida por una proteína aún desconocida.

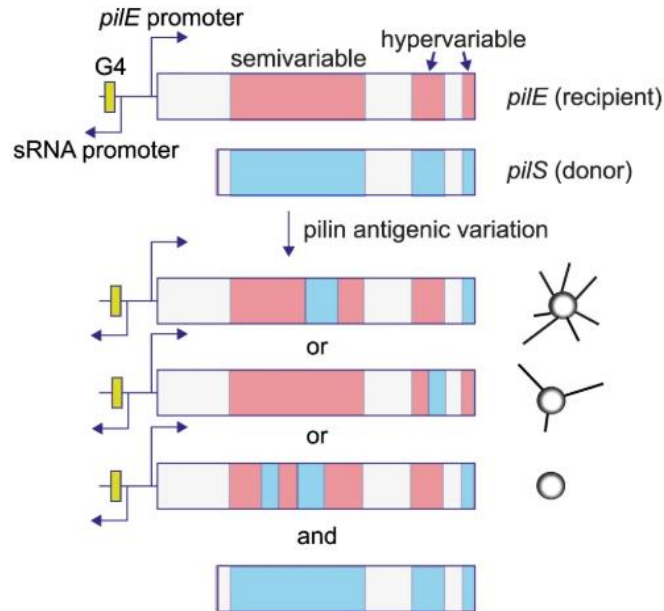


Figura 28. Esquema de la variación antigénica de los genes *Pilina* en *Neisseria*. La recombinación homóloga intergénica se dará entre la subunidad *pilE* y la *pilS*, en un proceso dependiente del motivo G4 y de *recA* (Zöllner et al, 2017).

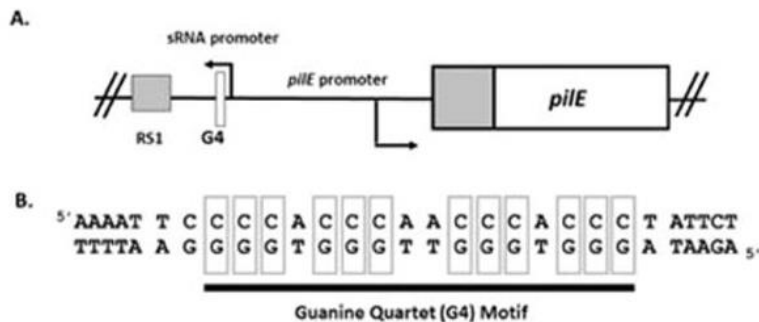


Figura 29. A) Mapa genético que muestra la ubicación de la secuencia G4 asociada a *pilE* y el promotor sRNA, necesario para la variación antigénica en el locus de *pilE*. B) Secuencia upstream de *pilE* que forma un G4. La mutación de los residuos de guanina lleva a la pérdida de la variación antigénica (Oberfell, Seifert, 2014).

Posteriormente, puede ocurrir un corte en la hebra opuesta a G4, posiblemente inducido por una horquilla de replicación estancada en la cadena principal. El sustrato mellado es procesado por la endonucleasa RecJ y las helicasas RecQ o Rep, lo que permite a RecA mediar la recombinación promovida mediante su unión a la estructura G4 junto con RecOR, utilizando regiones de homología entre *pilE* y *pilS* donante. RecG y RuvABC procesan y resuelven el intermediario de recombinación (**Figura 30**).

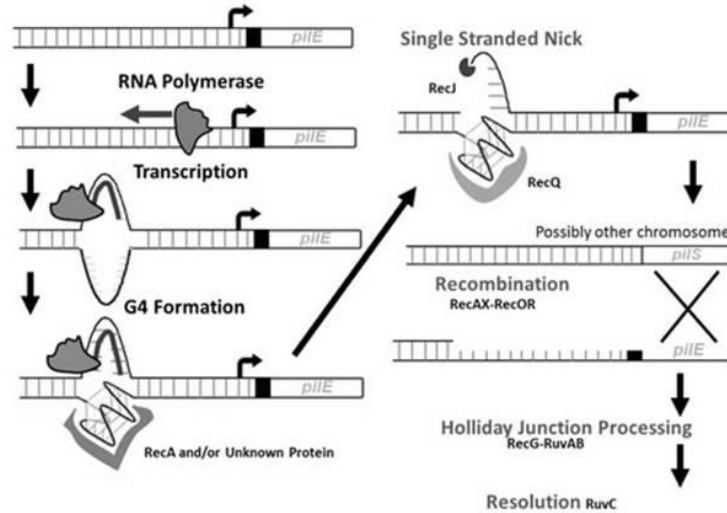


Figura 30. Mecanismo de recombinación homóloga intergénica en *Neisseria*, indicando las diferentes proteínas/complejos que intervienen en este (Saleh, 2014).

Por otro lado, la recombinación puede ocurrir entre genes *pil* situados en el mismo cromosoma o con genes introducidos en la bacteria tras la transformación con DNA exógeno.

En conjunto, estos procesos son responsables de una elevada frecuencia de recombinación que se ha estimado en aproximadamente 5×10^{-4} suceso/célula/generación.

A través de estos mecanismos de variación, junto a la eficiencia de transformación natural que tienen las especies de *Neisseria*, hace que el repertorio potencial de diferentes secuencias de aminoácidos para las pilinas de *Neisseria* se ha calculado ser mayor de 10^7 variantes.

Debido a esta notable variabilidad, los pili bacterianos pueden evadir eficientemente la respuesta inmunitaria humana.

4.2. Mecanismos on/off

Contrario a los genes *pilE*, los genes codificantes para las proteínas Opa y PilC representan

variantes génicas completas que experimentan frecuentes cambios de activación (on/off) pero raramente recombinan entre sí. Estos cambios de activación (on/off) se conocen como variación de fase y se inician cuando se dan mutaciones en un locus determinado en una población para obtener un pequeño número de variantes de OFF (mutantes) dentro de una población de ON (no mutantes). Bajo una presión selectiva, la variante menor (mutante) se multiplica a un ritmo mayor para obtener una población con una mayoría de variantes OFF combinadas con un pequeño número de variantes ON (**Figura 31**).

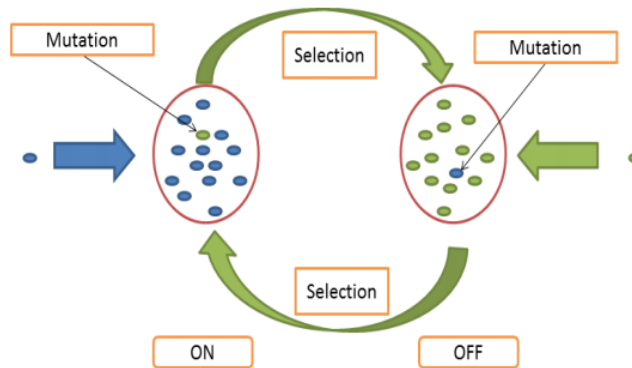


Figura 31. Variación de fase en *Neisseria* de fase de ON a OFF y de OFF a ON (Saleh, 2014).

Estos cambios de expresión ocurren a través de un mecanismo de deslizamiento de DNA independiente de RecA que implica secuencias de nucleótidos repetidas dentro de las regiones codificantes de los genes; la variación del número de unidades de repetición altera la fase de lectura y consecuentemente afecta la traducción en productos génicos no funcionales (**Figura 32**).

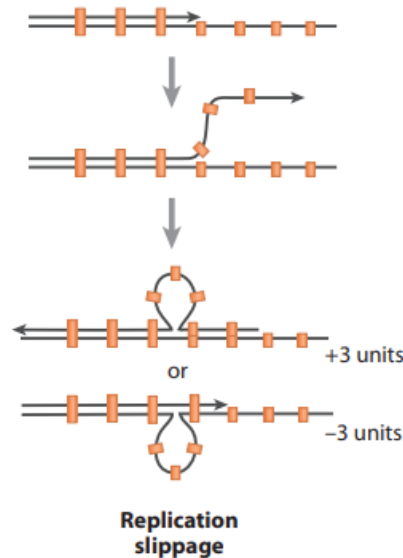


Figura 32. *Proceso de deslizamiento de DNA independiente de RecA en Neisseria. Durante la replicación del ADN, el ADN de una sola cadena que contiene unidades de repetición puede disociarse y desemparejarse transitoriamente, lo que resulta en la eliminación o adición de unidades de repetición (Gemayel et al, 2010).*

En el caso de los genes *opa*, la unidad de repetición es una secuencia pentamérica (CTCTT) mientras que los genes *pilC* son controlados mediante una fila de residuos C; ambas "repeticiones codificantes" (CR) se localizan en la parte de los genes que codifica para el péptido señal que dirige la secreción de la proteína (**Figura 33**).

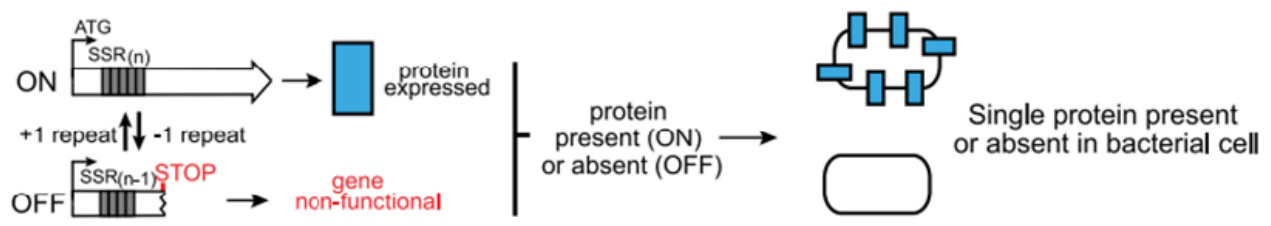


Figura 33. *Variación de fase en los genes *opa* y *pilC*. Ambos poseen secuencias cortas repetidas (SSR) que son CTCTT en el caso de *opa* y residuos de C en el caso de *pilC*, localizadas en el marco de lectura abierta (ORF) del gen, esto resulta en un cambio ON-OFF de la expresión de la proteína codificada (Phillips et al, 2019).*

La variación por CR es un proceso extremadamente frecuente que afecta a 1 de cada 100 descendientes de una célula parental.

Otro método de controlar la expresión de un gen vía una secuencia repetida ocurre en el

gen meningococal *opc*, donde un homopolímero variable de C, localizados entre los elementos reguladores -35 y -10 del promotor *opc*, va a alterar la actividad transcripcional, al influir sobre la interacción de la RNA polimerasa con el promotor (**Figura 34**).

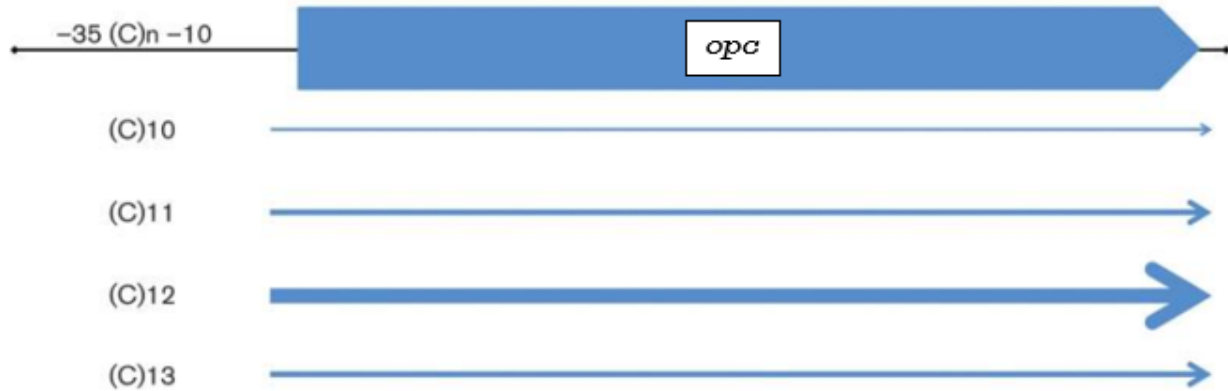


Figura 34. Variación de fase en el gen *opc* en la que cambios en un tracto repetido, alteran el frente y el espaciado de los elementos promotores -10 y -35 y el nivel de transcripción del gen, representado por los anchos de las flechas (Zelevska, et al, 2016).

Los mecanismos responsables de esta alteración del número de repeticiones, y la subsiguiente expresión del producto génico, se piensa que van a operar al nivel de la replicación del DNA.

5. RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA VARIACIÓN GENÉTICA.

5.1. Los pili.

Los pili, unas organelas que sobresalen de la superficie bacteriana, se conocen como pilis de tipo IV. Son filamentos dinámicos que polimerizan y despolimerizan rápido a partir de un pool de subunidades de pilina (pilE). El control de los mecanismos de retracción tiene lugar por proteínas codificadas en los genes *pilC*. Son un requerimiento absoluto para la iniciación de una infección al actuar de anclaje de la bacteria con las células epiteliales. Estas estructuras también se han relacionado con la capacidad de transformación por DNA exógeno que tienen estas bacterias. Todas estas funciones se ilustran en la **Figura 35** y son posibles gracias a la actividad dinámica de los pili IV que le permite retraerlos.

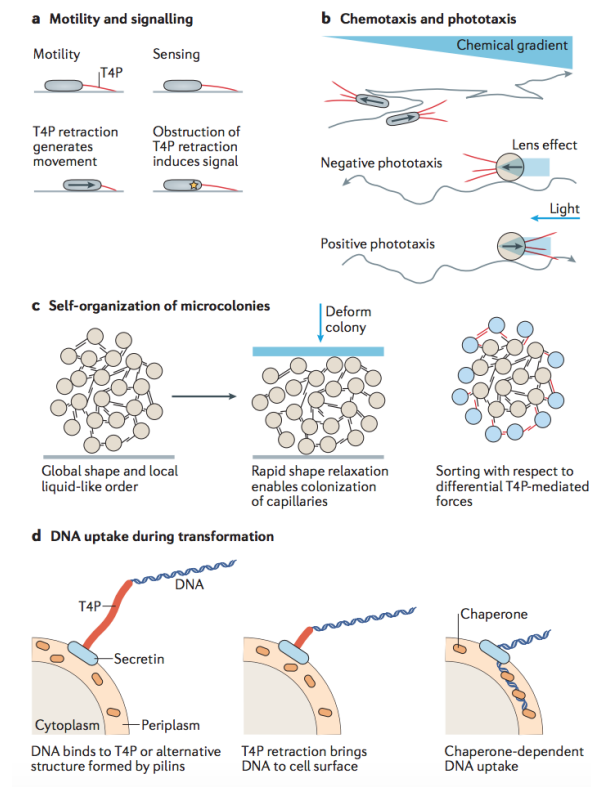


Figura 35. Actividades dependientes de los pili. La retracción de los pili tipo IV permite a) la motilidad y señalización; b) permite la quimiotaxis y fototaxis; c) la organización en microcolonias formando agrupaciones similares a los biofilms; d) la transformación de DNA también está mediada por estas estructuras (Craig et al, 2019).

La unión de los pili parece ser específica hacia las células humanas y, por tanto, los pili representan un determinante fundamental del **tropismo** de especie de *Neisseria*. Por ejemplo, pilC tienen afinidad por CD46 y pilE tiene afinidad por CD147 (predominante en cerebro y células endoteliales) en *N. meningitidis*, mientras que Opa tiene una alta especificidad por el receptor de neutrófilos CEACAM. Todos estos factores contribuyen al tropismo como puede verse en la **Figura 12**.

Debido a su localización también son dianas fuertes para la respuesta de anticuerpos. Sin embargo, los esfuerzos para desarrollar una vacuna basada en los pili hasta hace poco habían fracasado debido a la enorme variabilidad de los pili, y particularmente de la pilina.

Por tanto, permanece como una cuestión crucial el explicar cómo los pili engañan al sistema inmunitario mientras que siguen cumpliendo su función de adhesinas. Este problema tiene grandes implicaciones teóricas y prácticas que no están necesariamente restringidas al sistema

Neisseria.

Actualmente, ya existen dos vacunas licenciadas (Bexsero y Trumeba) contra el meningococo serogrupo B o MenB en Europa. Están basadas en proteínas sub-capsulares que se encuentran no solo en el serogrupo B pero también en otras cepas de meningococos. Se ha visto que incluso podrían proteger de aquellos serotipos distintos de B e incluso gonococos.

5.2. Evasión de la respuesta inmunitaria y variación adaptativa.

Es interesante distinguir entre las dos funciones principales de la variación genética, es decir, una función de evasión y una función adaptativa, como se ilustra en la **Figura 36**.

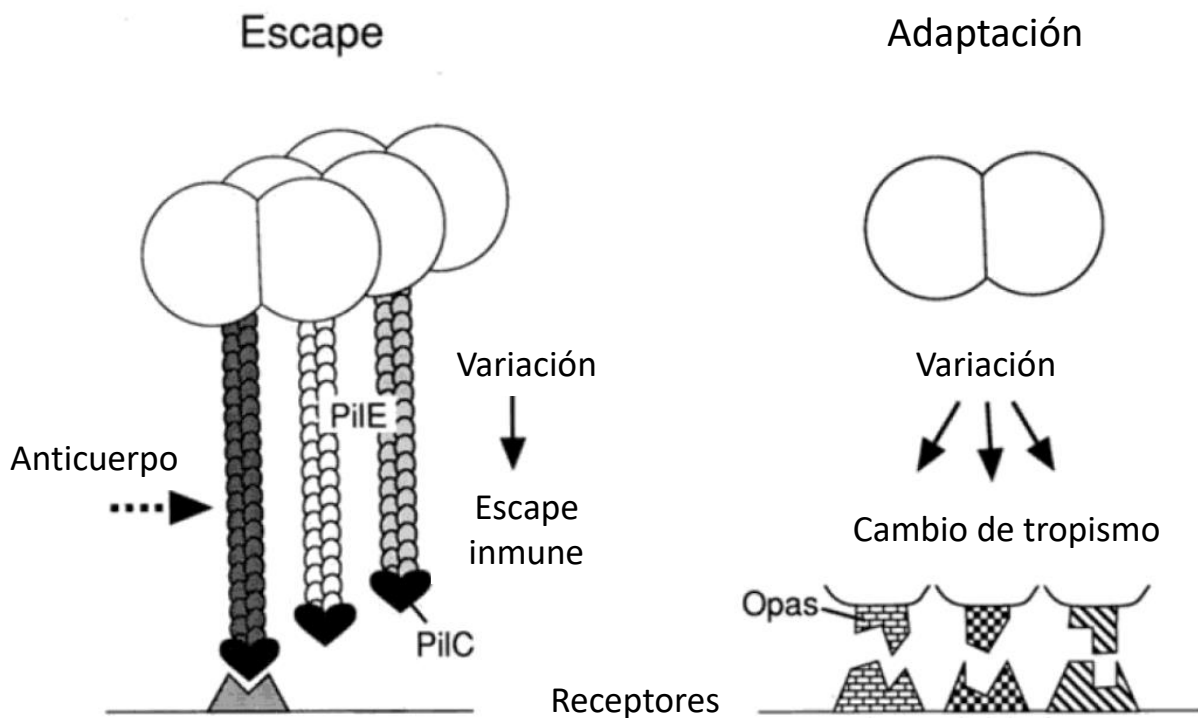


Figura 36. Figura modificada del libro *Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals: Molecular and Cellular mechanisms*. J.L Dangl (Ed). El reconocimiento de los receptores tiene lugar a través de PilC para poder evadir la respuesta inmune por anticuerpos a través de pilE, gracias a su gran variabilidad. En cuanto a la adaptación, tiene lugar a través de las proteínas Opa, cuando se da variación conlleva un cambio de tropismo.

La variabilidad extrema de la subunidad mayoritaria del pili (PilE) hace que represente un factor de escape o evasión. Sin embargo, ¿cómo se consigue mantener la integridad funcional?

Existen, al menos, dos funciones conservadas en los pili, una es la polimerización de los

pili, y, en segundo lugar, la interacción con un receptor conservado. La función de polimerización no es problemática debido a que ésta implica una región hidrofóbica conservada de PilE que ni está expuesta en superficie ni es inmunosusceptible. Además, como se indicó arriba, esta región situada en el extremo N-terminal no está sometida a recombinación y variación (ver **Figura 37 y 38**). Esta adaptación se ve favorecida por las interacciones físicas locales dentro de los biofilms a través de la variación antigénica. Destacar, que la región hipervariable de pilE solo se encuentra en la pilina de clase I, mientras que la mayoría de las pilinas clase II carecen de esta región hipervariable. Las pilinas de clase I se encuentran mayoritariamente en *N. gonorrhoeae* mientras que las de clase II en las neisserias comensales y meningococos, aunque estos últimos siguen siendo infecciosos.

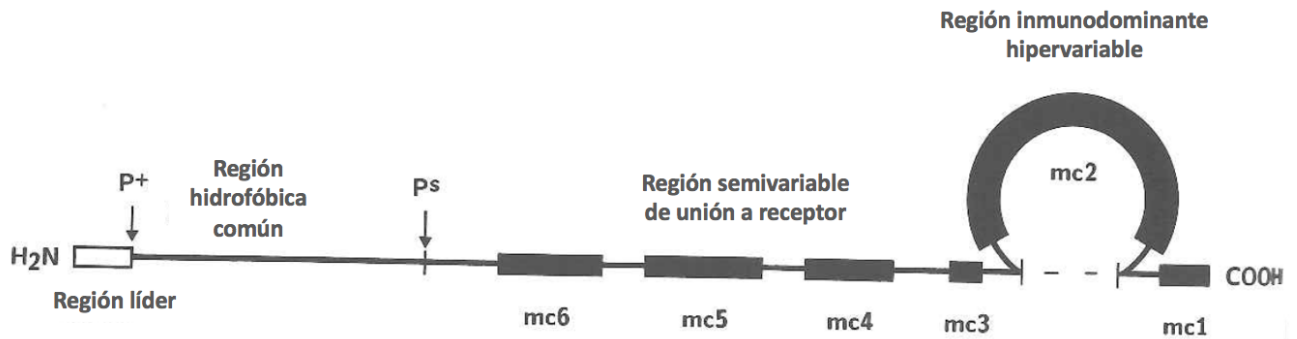


Figura 37. Variación genética en pilE indicando donde se encuentra la región hipervariable con respecto al promotor. (Recordemos que la traducción empieza en el N terminal). Figura modificada de la figura *Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals: Molecular and Cellular mechanisms*. J.L Dangl (Ed.).

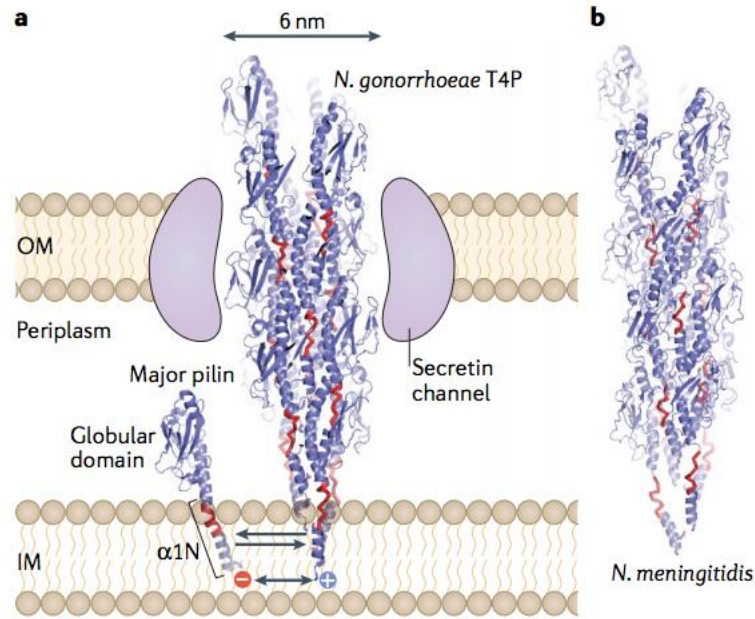


Figura 38. Estructura tridimensional de los pili de *N.gonorrhoeae* y *N.meningitidis*. La región N terminal o constante es la que se encuentra situada en la membrana interna como podemos ver en la figura (Craig et al, 2019) y en esta región es donde existe la mayor conservación del pili.

La cuestión es, sin embargo, cómo acomodar la función conservada de unión a receptor dentro de un contexto tan altamente variable como son los pili. Para solucionar este problema, la bacteria hace uso de una adhesina minoritaria, PilC, que es muy mucho menos variable. Datos recientes indican que PilC interacciona con el receptor celular CD46, que se encuentra en muchas células humanas y es también el receptor del virus del sarampión.

En conclusión, la variación PilE sirve principalmente para proteger a los pili de la interacción con los anticuerpos, pero parece inadecuada para modular la especificidad de receptor.

Para la variación adaptativa, el mecanismo genético subyacente debe evitar mutaciones y recombinaciones que conduzcan a fenotipos inviables, sino más bien debe basarse en la utilización de series preseleccionadas de genes. Esta situación se encuentra en el sistema de genes *opa*. Cada gen *opa* codifica una proteína Opa funcional capaz de reconocer distintos receptores celulares.

5.3. Tropismos celulares de las proteínas opaque (Opa).

Las proteínas Opa (de opacidad) son constituyentes mayoritarios de las membranas externas de las especies patogénicas de *Neisseria*. Son proteínas de un peso molecular en torno a 28-kDa, de carácter básico. El número de genes *opa* presente es gonococos (más de 12) es considerablemente mayor que el presente en meningococos (3-4).

Las proteínas Opa desempeñan un papel destacado en varias funciones adherentes, tales como adhesión interbacteriana e interacción con las células epiteliales humanas y células fagocíticas.

Se sabe que las adhesinas variables Opa y Opc son importantes determinantes del tropismo celular de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* y que la variabilidad de estas proteínas permite interacciones con múltiples tipos de células. Esto queda reflejado en la **Tabla 3**.

Estructuras de superficie / Propiedades	Aspectos estructurales	Función	Diana
Opa	8 cadenas barril β	Adhesión / invasión	Células epiteliales humanas, fibronectina
Opc	10 cadenas barril β	Adhesión / invasión	Células epiteliales y endoteliales humanas Vitronectina activada Fibronectina

Tabla 3. Tabla traducida a partir de la tabla (Virji, 2012). Estructura de Opa y Opc y resumen de su función y los tropismos celulares en *N.meningitidis*.

6. PAPEL DE LOS NEUTRÓFILOS EN LA PATOGÉNESIS DE NEISSERIA

El sello clínico de la infección por las neisserias patogénicas es una respuesta inflamatoria inducida por el sistema inmunitario innato, que se caracteriza por un importante influjo de neutrófilos. El subsecuente daño en los tejidos permite el acceso de las bacterias a sitios anatómicos secundarios, lo que va a ocasionar la morbilidad y la mortalidad asociadas a las infecciones neiseriales. Para *N. meningitidis*, estos sitios incluyen el torrente sanguíneo, la piel y las meninges, y para *N. gonorrhoeae* las trompas de Falopio, el corazón, la piel y las articulaciones. Las infecciones en estos sitios producen coagulación intravascular y shock séptico por *N. meningitidis*

y enfermedad inflamatoria pélvica, que desemboca en embarazo ectópico e infertilidad, dermatitis, endocarditis y artritis por *N. gonorrhoeae*. Debido a la ausencia de cápsula *N. gonorrhoeae* requiere que haya un contacto sexual directo, o perinatal (ya que se ha visto que afecta a mujeres embarazadas de forma asintomática; su infección puede ser a través del tracto urogenital, anorrectal o incluso la mucosa faríngea). En el caso de los hombres tiene lugar a través de la uretra y en el caso de mujeres puede infectarse el ectocervix. Aunque suele ser asintomática en un ~10-25%. *N. meningitidis* al tener cápsula puede infectar sin necesidad de ese contacto directo. También puede. Ser asintomática, puede infectar el tracto respiratorio superior y faríngea.

La primera etapa en la infección es la colonización del epitelio de las mucosas (**Figura 39**). Como se ha indicado antes, los Pili tipo IV junto con las proteínas Opa son los responsables del anclaje inicial a las células epiteliales de las superficies de las mucosas.

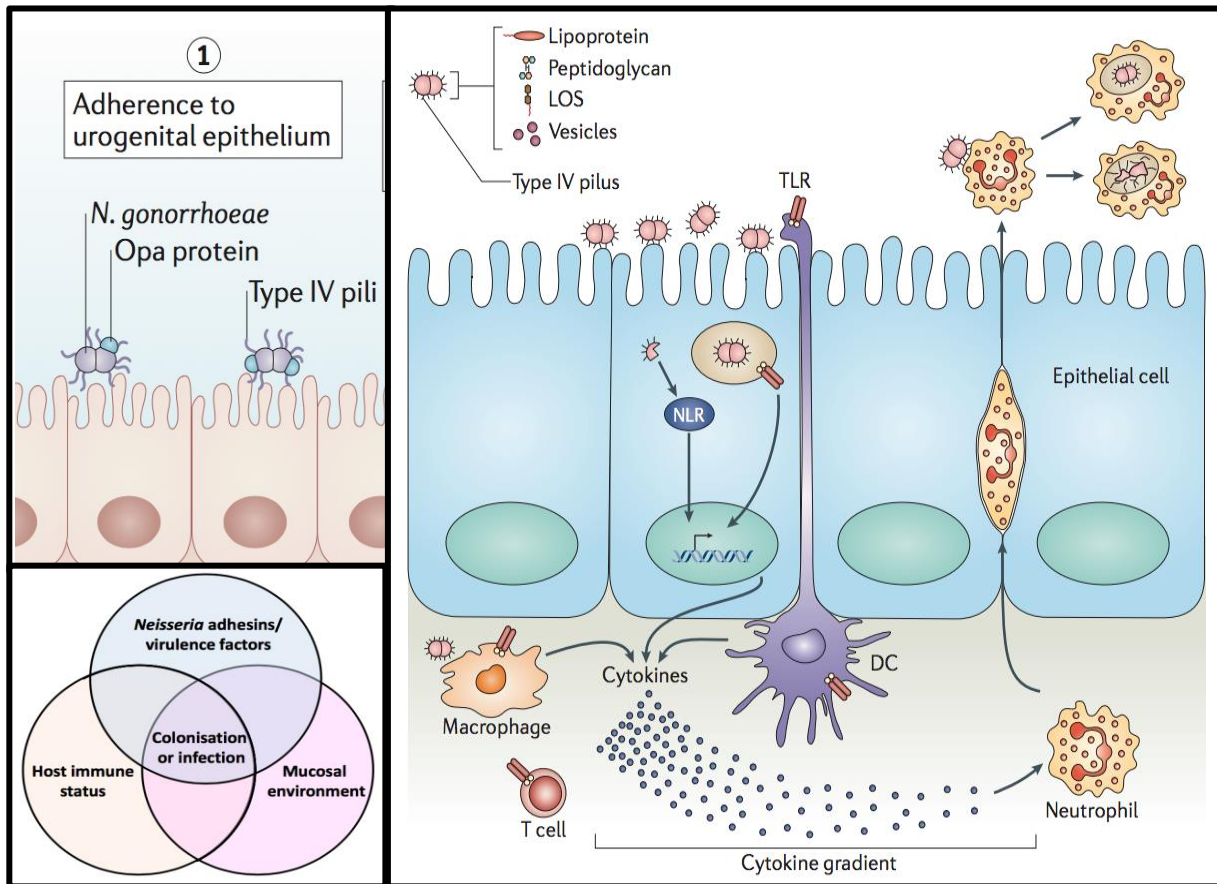


Figura 39. Figura modificada a partir de la figura (Criss and Seifert, 2012), la figura (Hung and Christodoulides, 2013) y la figura (Quillin and Seifert, 2018). Primera etapa de la colonización del epitelio de las mucosas, mediada por pili IV y por proteínas Opa. Para que la colonización

tenga lugar, ha de existir un balance entre las adhesinas y los factores de virulencia, el ambiente de las mucosas y el estatus inmune del huésped.

La presencia de *Neisseria*, al igual que la de otras bacterias, va a ser detectada por las propias células epiteliales y células centinelas del sistema inmunitario presentes en el epitelio, entre las que se encuentran las células **Th17** (“T helper 17”), macrófagos y células dendríticas. Estas células van a detectar la infección a través de las moléculas asociadas a la membrana TLR (“Toll-like receptors”) y los receptores citoplasmáticos NLR (“NOD-like receptor”). Como consecuencia, la infección por las neiserias patogénicas promueve la liberación local de **IL-8**, **IL-6**, **TNF**, **IL-1 β** y otras citoquinas, creando un microambiente que atrae y recluta a los neutrófilos (**Figura 40**).

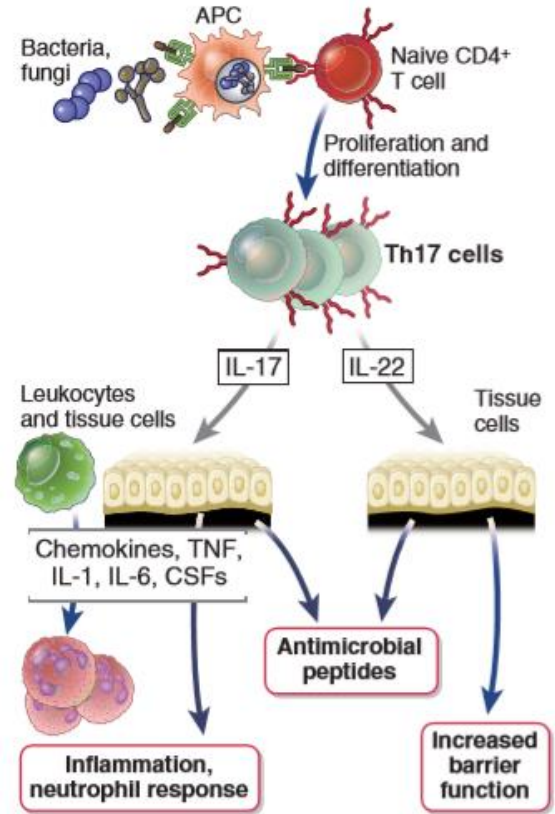


Figura 40. Las citoquinas producidas por Th17 estimulan la producción local de quimioquinas que reclutan neutrófilos y otros leucocitos, aumentan la producción de péptidos antimicrobianos y promueven las funciones de barrera del epitelio. (Abbas et al, 2018)

Los neutrófilos tienen actividades antimicrobianas tanto extracelulares como intracelulares. Las trampas extracelulares de los neutrófilos y las especies ROS (“reactive oxygen species”) combaten a los microorganismos extracelulares, mientras que las bacterias que son captadas por los neutrófilos son introducidas en un fagosoma que contiene ROS, enzimas degradativas y péptidos antimicrobianos (**Figura 41**).

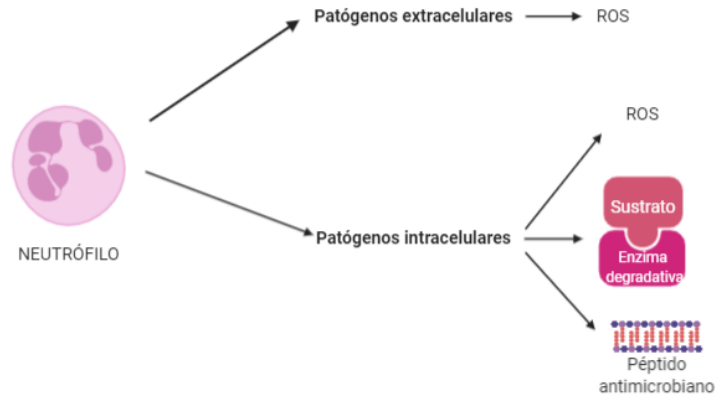


Figura 41. Esquema de las respuestas de los macrófagos frente a patógenos extracelulares e intracelulares.

Pero las neiserias patogénicas son capaces de modular y evadir estos mecanismos antimicrobianos. Entre los factores que protegen de las actividades microbicidas de los péptidos antimicrobianos está la metaloproteinasa NG01686. Además, la bacteria tiene en su membrana la bomba de eflujo **MtrC–MtrD–MtrE**, que es muy activa para sacar péptidos antimicrobianos del interior de la bacteria.

En cuanto a esta bomba, es una de las responsables de la resistencia a antibióticos como **Azitromicina** (Azi) en la cepa *Neisseria gonorrhoeae*. Los aislados resistentes contienen secuencias de DNA donadas por las cepas *N. lactamica* o *N. meningitidis* mediante procesos de transferencia horizontal de genes. Esto genera secuencias mosaico en el locus *mtr* que codifica la bomba de eflujo. Este locus *mtr* contiene tres gens (*mtrC*, *mtrD* y *mtrE*) dentro de un operón que codifica la bomba de eflujo MtrCDE y un gen transcripcionalmente divergente que codifica para el represor de la bomba, **MtrR**. (**Figura 42 y 43**).

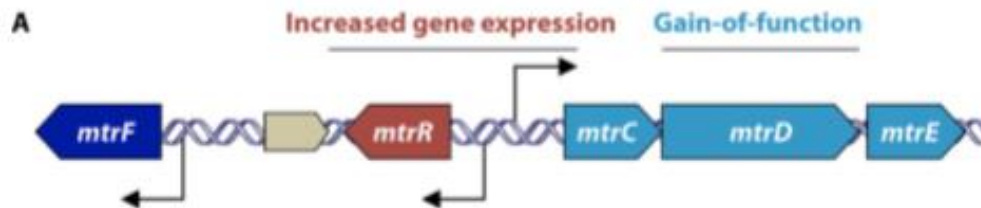


Figura 42. Secuencia genómica que codifica para la bomba de eflujo MtrC–MtrD–MtrE. Las líneas horizontales indican las regiones donde tuvo lugar la recombinación genética con el DNA de *N. lactamica* y *N. meningitidis*. (Wadsworth et al, 2018)

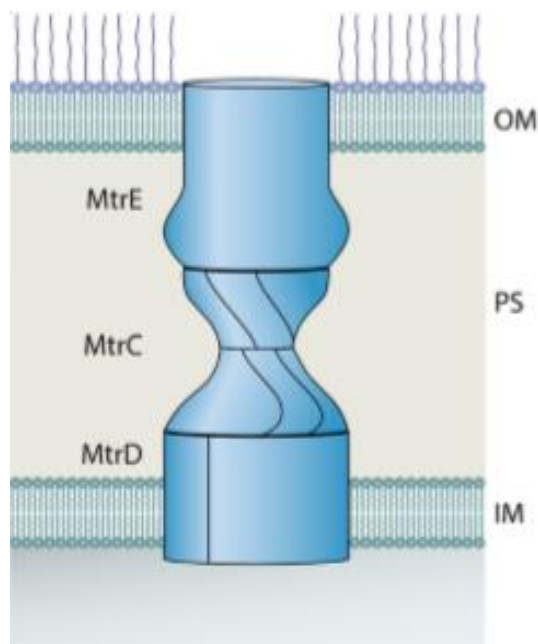


Figura 43. Estructura de la bomba de eflujo *MtrC–MtrD–MtrE*. *MtrD* se encuentra en la membrana interna (IM), *MtrC* en el espacio periplásmico (PS) y *MtrE* en la membrana externa (OM). (Wadsworth et al, 2018)

Por otro lado, las neiserias patogénicas evitan la fagocitosis por los neutrófilos mediante diversas maneras. Así, entre otras, *N. meningitidis* produce una cápsula de polisacárido que impide la fagocitosis al aumentar la carga negativa de la superficie bacteriana. Cabe destacar la capacidad que tiene la bacteria de sintetizar o no la cápsula a lo largo de su ciclo de vida. *N. gonorrhoeae* no produce la cápsula.

Aunque las neiserias patogénicas pueden evitar la fagocitosis, se detectan numerosas bacterias en el interior de neutrófilos procedentes de pacientes con gonorrea o con meningitis meningocócica. De hecho, el primer nombre que se le dio a *N. meningitidis* fue *Diplococcus intracellularis*. Incluso, hay datos que implican a algunas proteínas Opa como mediadores de la fagocitosis por neutrófilos. En la **figura 44** se muestra una imagen de microscopía donde se observan gonococos en el interior de un neutrófilo en una preparación de exudado de paciente con gonorrea.

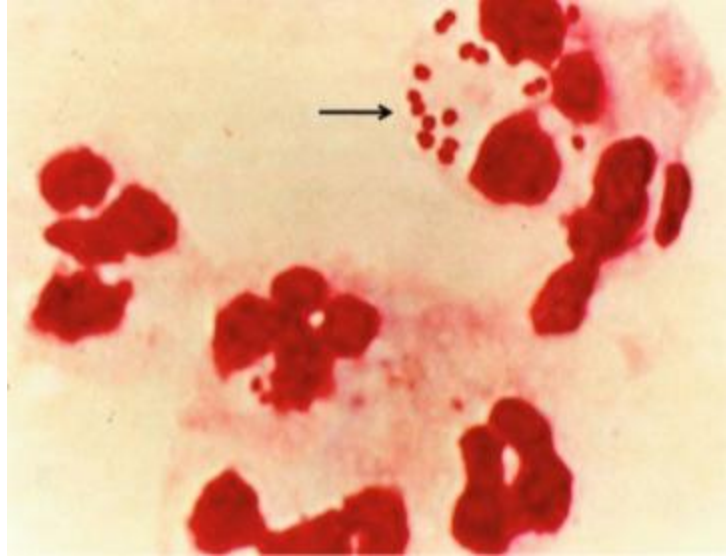


Figura 44. Fotografía de los gonococos dentro de un neutrófilo. (Rouphael & Stephens, 2012)

Para muchas de las bacterias, la fagocitosis es su final. Sin embargo, una fracción de las neisnerias patogénicas parece sobrevivir y replicarse incluso dentro de los neutrófilos.

Además, las bacterias impiden la apoptosis de los neutrófilos. Los neutrófilos son células muy diferenciadas con vidas media de horas, por lo que la internalización puede considerarse una vía muerta para *Neisseria*, salvo que alargue la vida de estas células. Y, efectivamente, las neisnerias patogénicas modulan los programas apoptóticos de los neutrófilos.

Por otro lado, las neisnerias patogénicas son capaces de resistir al daño oxidativo promovido por los neutrófilos. Los neutrófilos activados ensamblan la enzima multimérica NADPH oxidasa sobre la membrana del fagosoma o la membrana citoplasmática. La **NADPH oxidasa** genera superóxido, que de forma espontánea o catalizada se dismuta a peróxido de hidrógeno; a su vez, el peróxido de hidrógeno es utilizado por la enzima, presente en los gránulos del neutrófilo, mieloperoxidasa para generar ácido hipocloroso. Estas ROS son microbicidas debido a su habilidad para dañar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Además, la NADP oxidasa también puede funcionar como un canal de protones. La oxidación del NADPH y el transporte de electrones al interior del fagosoma genera un potencial de membrana en el fagosoma que facilita el influjo de protones y la acidificación. En respuesta al potencial de membrana, se incrementa la secreción de gránulos (**Figura 45**).

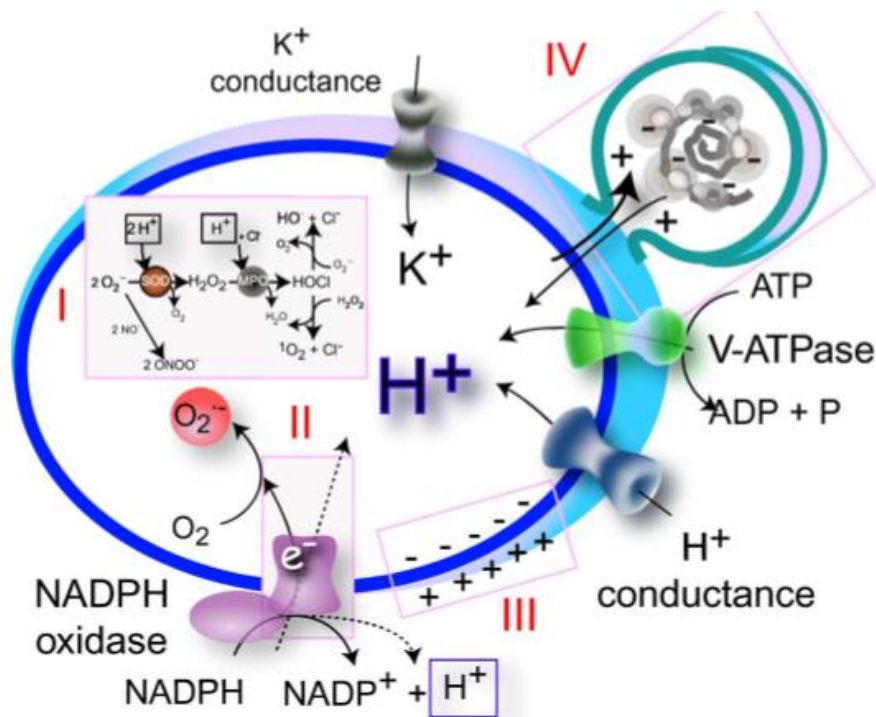


Figura 45. Oxidación y homeostasis iónica en los fagosomas. (I) La producción de aniones superóxido provoca el consumo de protones durante la dismutación, generando otras especies reactivas de oxígeno. (II) La NADPH oxidasa funciona como canal de protones. (III) La oxidación del NADPH y el transporte de electrones dentro del fagosoma genera un potencial de membrana en la membrana del fagosoma que promueve el influjo de protones y la acidificación. (IV) La translocación de cationes en respuesta al potencial de membrana aumenta la secreción de gránulos. (Lee et al, 2003)

Para protegerse de las ROS, las neiserias patogénicas codifican varias proteínas que detoxifican a estos compuestos (catalasa, citocromo-c peroxidasa y superóxido dismutasa) o los apantallan (sistema de transporte de MnII, MntABC) o reparan los daños oxidativos en el DNA o las proteínas (MutY, RecA, sistema Uvr y MsrAB). Adicionalmente, *N. meningitidis* contrarresta a las ROS mediante el **transportador de L-glutamato (GltT)** para captar L-glutamato, que es convertido en glutatión que ayuda a mantener el potencial redox citoplasmático

El mecanismo que se propone para esto último es el siguiente: *N. meningitidis* se une a las células endoteliales del cerebro y forma colonias. La concentración de glutamato alrededor de estas colonias puede ser reducida gracias a las bacterias que utilizan el transportador GltT. Esto, podría estimular el citoesqueleto de la célula que tras reorganizarse favorecería la entrada del meningococo a la célula. Este glutamato que se ha conseguido gracias al transportador es

convertido en glutatión dentro de *N. meningitidis* y tiene un papel antioxidante muy importante para la supervivencia en el interior de la célula hospedadora. Además, este glutamato es utilizado por la bacteria como nutriente. (**Figura 46**).

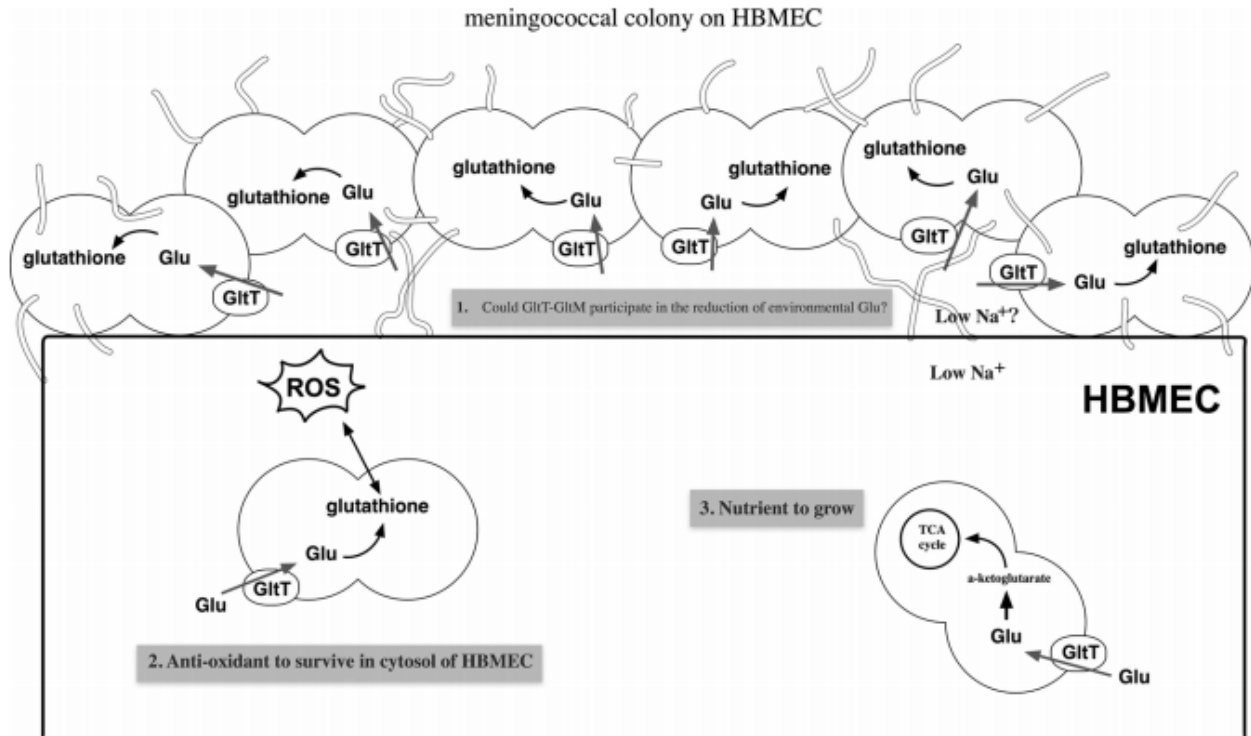


Figura 46. Representación esquemática del transportador GltT en la infección de *N. meningitidis* en células endoteliales del cerebro (HBMEC, del inglés: Human Brain Microvascular Endothelial Cells). Paso 1. La concentración de glutamato cerca de las colonias disminuye por la entrada de glutamato en la bacteria a través el transportador. Paso 2. Durante la adhesión e invasión de las células, el L-glutamato obtenido a través del transportador se convierte en glutatión que parece ser antioxidante. Paso 3. *N. meningitidis* utiliza el glutamato interno como nutriente. (Takahashi et al, 2015)

En resumen, las neiserias patogénicas, como resultado de una larga co-evolución con el hospedador, han establecido mecanismos para aprovechar en su beneficio a la respuesta inmunitaria innata y, en particular, a los neutrófilos. Así, los neutrófilos son reclutados en números grandes a los sitios de infección, pero la bacteria es capaz de sobrevivir y replicarse dentro o en las inmediaciones de los neutrófilos, ya que la bacteria dispone de proteínas especializadas para defenderse de los mecanismos microbicidas de los neutrófilos.

Es más, estos patógenos se asocian a los neutrófilos para ayudarse en la captación de nutrientes, para protegerse del sistema inmunitario y para la transmisión a tejidos más profundos

del cuerpo e incluso a otros hospedadores.

En cuanto a la captación de nutrientes, hay que tener en cuenta que las neisserias patogénicas residen principalmente sobre las células epiteliales, donde el aporte de nutrientes proveniente de las secreciones en las mucosas es bastante limitado. Como parte de la respuesta inflamatoria frente a la infección, el influxo de neutrófilos va a provocar una liberación de componentes del suero que, junto al daño en los tejidos circundantes, va a proveer de nutrientes a las bacterias extracelulares. Por otro lado, la fagocitosis de la bacteria por los neutrófilos va a permitir a las neisserias patogénicas el acceso a nutrientes intracelulares (**Figura 47A**).

Dentro de los neutrófilos, las bacterias se encuentran protegidas de la respuesta humoral. Además, los neutrófilos no funcionan como células presentadoras de antígenos, así la persistencia dentro de los neutrófilos protege a la bacteria de la respuesta inmunitaria mediada por células, por ejemplo, de los linfocitos T citotóxicos. Además, como se comenta arriba, la bacteria es capaz de alargar la vida de los neutrófilos, lo que va a contribuir a la persistencia del patógeno (**Figura 47B**).

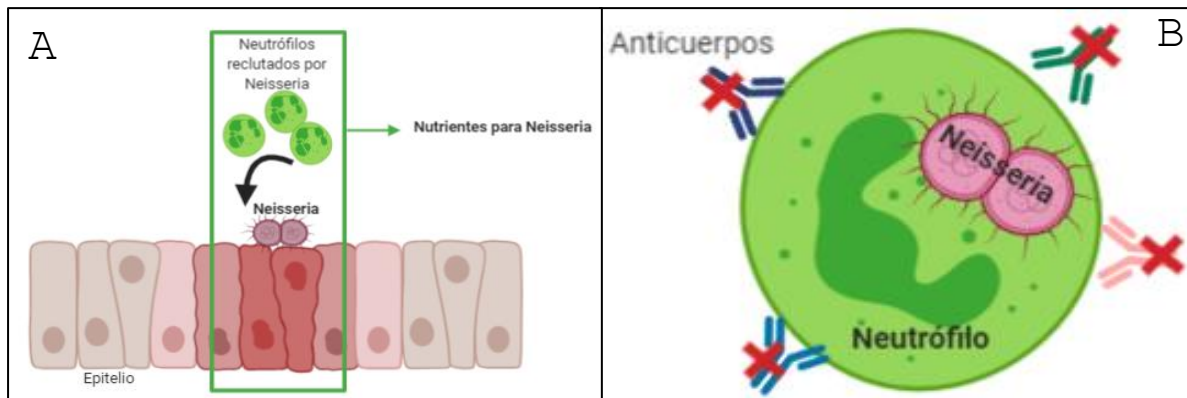


Figura 47. Panel A. Mecanismos de captación de nutrientes por parte de *Neisseria* (cuadrado verde). Los nutrientes pueden proceder de las células infectadas o bien de los neutrófilos reclutados durante la infección. **Panel B.** *Neisseria* dentro de un neutrófilo.

Aunque una pequeña fracción de las neisserias patogénicas atraviesan las monocapas epiteliales y endoteliales, estas bacterias no son particularmente móviles. Pues el organelo que podría estar implicado en movilidad, los **pili tipo IV**, en este caso, su principal función es impedir la diseminación, ya que favorece el anclaje a los tejidos del hospedador y la formación de las microcolonias bacterianas. En este sentido, los neutrófilos también parecen facilitar la

diseminación de la bacteria. Por un lado, el influjo de neutrófilos y el ambiente inflamatorio produce daños locales en los tejidos, creando brechas en el epitelio por donde las bacterias pueden pasar. Por otro lado, los mismos neutrófilos pueden transportar a bacterias viables a nuevos lugares. Este mecanismo sería responsable de las principales manifestaciones clínicas de las infecciones por *N. meningitidis* (meningocemia y meningitis) y también podría ser responsable de la diseminación de las infecciones gonocociales asociadas con los procesos de artritis, endocarditis y dermatitis (**Figura 48**).

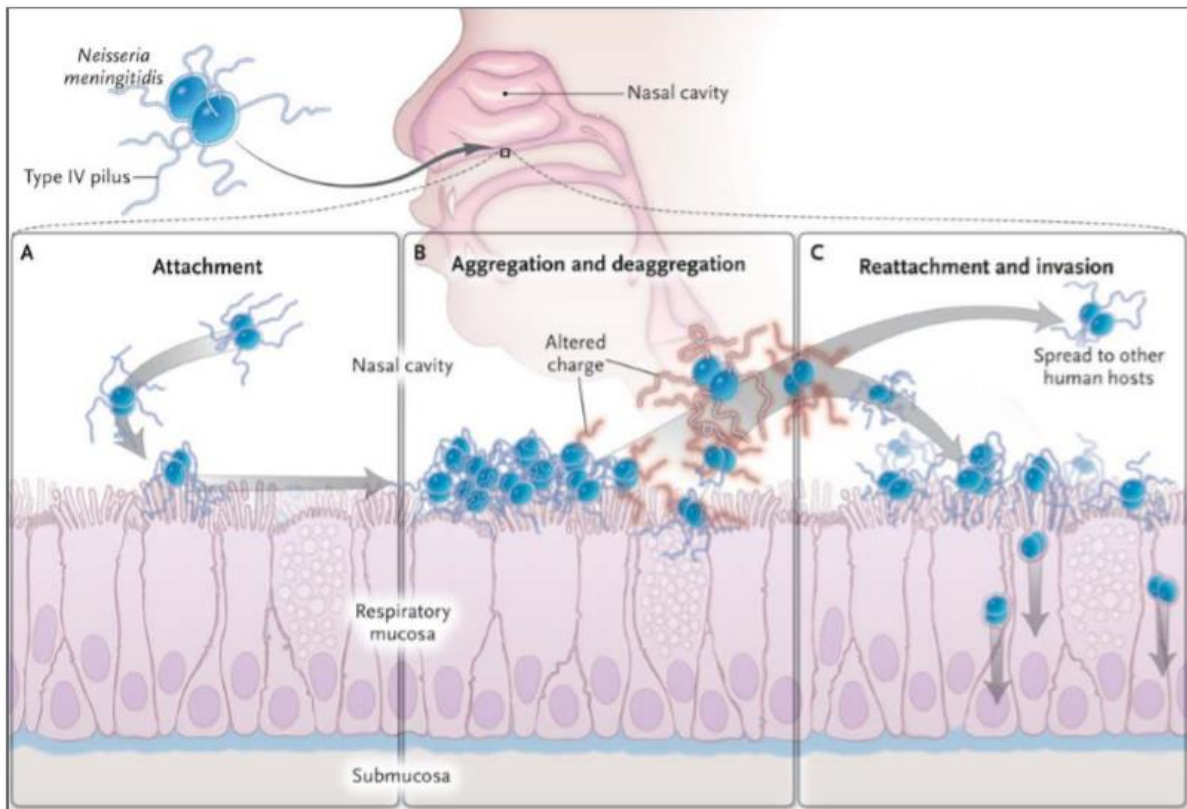


Figura 48. El paso inicial para la colonización es el anclaje a través del pili tipo IV (panel A). Después del anclaje tiene lugar la multiplicación y agregación de la bacteria (Panel B). La bacteria se disgrega y puede dar lugar a una infección sistémica (Panel C). (Quagliarello, 2011)

7. REFERENCIAS.

- Abbas, A. K., Litchman, A. H., & Pillai, S. (2018). Differentiation and Functions of CD4 Effector T Cells. In *Cellular and Molecular Immunology*. (9 ed., p. 239). Elsevier.
- Aparecida, C., Rodrigues, C. and Oliveira, L. De (2018) 'Prevalence of Neisseria Gonorrhoeae Infections in Pregnant Women : A Systematic Review', *Revista Brasileira de Ciências Médicas e da Saúde*, 6(6), 1–5.
- Beek, D. Van De, Brouwer, M. et al. (2016). Community-acquired bacterial meningitis. Nature disease primers. *Nature Publishing Group*, 2, 1–21.
- Christodoulides M. (2019) Basic Methods for Examining Neisseria gonorrhoeae Interactions with Host Cells In Vitro. In: Christodoulides M. (eds) Neisseria gonorrhoeae. *Methods in Molecular Biology*, vol 1997. Humana, New York, NY
- Coureuil, M. *et al.* (2019) 'Molecular interactions between Neisseria meningitidis and its human host', *Cellular Microbiology*, 21 (11); 1–11.
- Craig, L., Forest, K. T. and Maier, B. (2019) 'Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences', *Nature Reviews Microbiology*. Springer US, 17(7), pp. 429–440.
- Criss, A. K. and Seifert, H. S. (2012) 'A bacterial siren song: Intimate interactions between Neisseria and neutrophils', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 10(3), pp. 178–190.
- Fernández L. (2000). Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 24 (1), 21-44
- Gemayel R, Vences MD, et al (2010). Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annu Rev Genet*. 44(1): 445–477.
- Giancchetti, E. *et al.* (2015) 'Neisseria meningitidis infection: Who, when and where?', *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13(10), pp. 1249–1263.
- Grohmann E et al (2018). Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*: 107 (4), 455-471.
- Hollingshead, S. and Tang, C. M. (2019) 'An Overview of Neisseria meningitidis', in *Neisseria meningitidis: Methods and Protocols*, 1969: 1-16.
- Hung, M. C. and Christodoulides, M. (2013) 'The biology of Neisseria adhesins', *Biology*, 2(3), pp. 1054–1109.
- Johnson, M. B., & Criss, A. K. (2011). Resistance of Neisseria gonorrhoeae to neutrophils. *Frontiers in Microbiology*, 2, 1–12.
- Jong Kim W et al (2019). Commensal Neisseria kill Neisseria gonorrhoeae through a DNA-dependent mechanism. *Cell Host and Microbe*; 26 (2), 228-239.

- Lee, W. L., Harrison, R. E., & Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*, Vol. 5, pp. 1299–1306.
- Liu, G., Tang, C. M., & Exley, R. M. (2015). Non-pathogenic neisseria: Members of an abundant, multi-habitat, diverse genus. *Microbiology (United Kingdom)*, 161(7), 1297–1312.
- Mubaiwa D et al (June 2017). The sweet side of the pathogenic Neisseria: the role of glycan interactions in colonisation and disease. *Pathogens and Disease*, 75, 5.
- Obergfell KP, Seifert HS (2014). Mobile DNA in the pathogenic Neisseria. *Microbiol Spectrum* 3(1): MDNA3-0015-2014.
- Pachulec E et al (2014). Functional analysis of the gonococcal genetic island of *Neisseria gonorrhoeae*. *PLoS ONE*, 9 (10): e109613.
- Phillips ZN, Tram G, et al (2019). Phase-variable bacterial loci: how bacteria gamble to maximise fitness in changing environments. *Biochem Soc Trans.* 47: 1131–41.
- Pizza, M., Rappuoli, R. (2015). *Neisseria meningitidis*: pathogenesis and immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 23: 68–72.
- Quagliarello, V. (2011). Dissemination of *Neisseria meningitidis*. *N Engl J Med*; 364 (16): 1573-1575
- Quillin, S. J., & Seifert, H. S. (2018). *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 16(4), 226–240.
- Ramsey ME et al (2011). The gonococcal genetic island and type IV secretion in the pathogenic *Neisseria*. *Frontiers in Microbiology*; 2 (61): 1-9.
- Reddy Marri P et al (2010). Genome sequencing reveals widespread virulence gene exchange among human *Neisseria* species. *PLoS One* 5 (7): e11835
- Rivero-Calle, I. *et al.* (2019) ‘Meningococcal Group B Vaccine For The Prevention Of Invasive Meningococcal Disease Caused By *Neisseria meningitidis* Serogroup B’, *Infection and Drug Resistance*, Volume 12, pp. 3169–3188.
- Rotman E, Webber DM, et al (2016). Analyzing *Neisseria gonorrhoeae* pilin antigenic variation using 454 sequencing technology. *J Bacteriol.* 198: 2470 –2482.
- Rotman, E. and Seifert, H. S. (2014) ‘ The Genetics of *Neisseria* Species ’, *Annual Review of Genetics*, 48(1), pp. 405–431.
- Rotman, E., & Seifert, H. S. (2014). The Genetics of *Neisseria* Species . *Annual Review of Genetics*, 48(1), 405–431.
- Rouphael, N. G., & Stephens, D. S. (2012). *Neisseria meningitidis*: Biology, microbiology, and epidemiology. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 799, pp. 1–20.
- Sánchez S, de Miguel T, et al (2019). Horizontal Gene Transfer Among *Neisseria* Species and Humans. In:

Villa T., Viñas M. (eds) Horizontal Gene Transfer. Springer, Cham.

Spencer-Smith R et al (2016). DNA uptake sequences in *Neisseria gonorrhoeae* as intrinsic transcriptional terminators and markers of horizontal gene transfer. *Microbial Genomics*, 2 (8): 1-11.

Takahashi, H., Yanagisawa, T., Kim, K. S., Yokoyama, S., & Ohnishi, M. (2015). Multiple functions of glutamate uptake via meningococcal GltT-GltM L-glutamate ABC transporter in *Neisseria meningitidis* internalization into human brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, 83(9), 3555–3567.

Virji, D. J. H. and M. (2012) ‘Meningococcal Ligands and Molecular Targets of the Host’, *Methods in Molecular Biology*, 799(1), pp. 143–152.

Virji, M. (2009). Pathogenic neisseriae: surface modulation , pathogenesis and infection control. *Nature Reviews Microbiology*, 7. (4), 274-286.

Vos M et al (2019). Sexual selection in Bacteria? *Trends in Microbiology*; 27 (12): 972-981.

Wadsworth, C. B., Arnold, B. J., Sater, M. R. A., & Grad, Y. H. (2018). Azithromycin resistance through interspecific acquisition of an epistasis-dependent efflux pump component and transcriptional regulator in *Neisseria gonorrhoeae*. *MBio*, 9(4).

Wanford, J. J. *et al.* (2018) ‘Phasome analysis of pathogenic and commensal *Neisseria* species expands the known repertoire of phase variable genes, and highlights common adaptive strategies’, *PLoS ONE*, 13(5), pp. 1–21.

Wang F et al (2017). Cryoelectron Microscopy Reconstructions of the *Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria gonorrhoeae* Type IV Pili at Sub-nanometer Resolution. *Structure*; 25, 9, 1423-1435.

Yan Zhang (2017). The CRISPR-Cas9 system in *Neisseria* spp., *Pathogens and Disease*: 75, (4), DOI: 10.1093/femspd/ftx036

Zelewska MA, Pulijala M, et al (2016). Phase variable DNA repeats in *Neisseria gonorrhoeae* influence transcription, translation, and protein sequence variation. *Microb Genom* (8): e000078.

Zöllner, R. *et al.* (2017) ‘Phase and antigenic variation govern competition dynamics through positioning in bacterial colonies’, *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–12.

Zöllner, R., Oldewurtel, E.R., et al (2017). Phase and antigenic variation govern competition dynamics through positioning in bacterial colonies. *Sci Rep* 7, 12151.

7.1. Sitios en Internet:

De Voer RM (2010). Meningococcal C specific immune responses: Immunity in an era of immunization with conjugate vaccine. Utrecht: Utrecht University. Web: <https://dspace.library.uu.nl/handle/1874/44558>

Ponencia de Programas y Registro de Vacunaciones (marzo 2019). Recomendaciones de vacunación frente a la enfermedad meningocócica invasiva. Comisión de Salud Pública del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2019. Web: https://www.mschs.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/vacunaciones/docs/Recomendacion_es_Vacunacion_Meningococo.pdf

Saleh, M (2014). Investigation of the Determinants and Biological Consequences of Phase Variation of the fetA gene of *Neisseria meningitidis*. University of Leicester. Web: <https://pdfs.semanticscholar.org/71e1/0da61d57a4895b8893968f05fcd8da152298.pdf>