"LEPTOSPIROSIS: CONOCIMIENTO DE LA PATOLOGÍA Y PROPUESTA DE DIAGNÓSTICO"

ANA MARÍA GARCÍA CALLEJAS

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS

FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN

PROYECTO CURRICULAR LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

BOGOTÁ D.C

2015

"LEPTOSPIROSIS: CONOCIMIENTO DE LA PATOLOGÍA Y PROPUESTA DE DIAGNÓSTICO"

ANA MARÍA GARCÍA CALLEJAS

Proyecto de grado para optar al título de Licenciada en Biología

Director

JULIO CESAR CALVO MOZO, PhD

Evaluador

NUBIA FARID BARRERA COBOS

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS

FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN

PROYECTO CURRICULAR LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

BOGOTÁ D.C

CONTENIDO

Pág.

RESUMEN…….. **3**

PROBLEMA……**4**

JUSTIFICACIÓN……**4**

OBJETIVOS……**6**

CAPÍTULO 1: LA LEPTOSPIROSIS Y EL AGENTE ETIOLÓGICO……**7**

CAPÍTULO 2: EPIDEMIOLOGÍA……...**12**

CAPÍTULO 3: PATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA……..**15**

CAPÍTULO 4: MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO……**18**

METODOLOGÍA ……**30**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN ……..**32**

CONCLUSIONES……**38**

BIBLIOGRAFÍA……...**39**

APÉNDICE 1: ARTÍCULO EN PROCESO DE PUBLICACIÓN: "DISEÑO DE PÉPTIDOS CON RESTRICCIÓN CONFORMACIONAL DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE *Leptospira interrogans*"……**45**

RESUMEN

La Leptospirosis es una enfermedad zoonótica causada por numerosas variedades de microorganismos pertenecientes al género Leptospira y que afectan en su mayoría a animales domésticos y silvestres, sin embargo se puede transmitir a seres humanos a través del contacto con la orina o carne del animal infectado .Las técnicas por las cuales se diagnostica la enfermedad son poco confiables debido a que la enfermedad presenta etapas en las que tanto la bacteria como los anticuerpos sufren posibles seroconversiones lo que hace lentos los procesos de tratamiento. Los péptidos sintéticos suelen ser usados para detectar anticuerpos en sueros, pero a menudo no son tan activos. Sin embargo, cuando se usan péptidos restringidos conformacionalmente para imitar fragmentos estructurados de proteínas pueden ser muy efectivos. En este trabajo se pretende realizar una revisión bibliográfica completa del tema haciendo énfasis en el conocimiento de la patología, riesgos, los métodos que se emplean para su diagnóstico, incidencia en la población, estudios que se han realizado a nivel de proteómica del patógeno causante de esta enfermedad entre otros, para de esta manera poder proponer un posible nuevo método de diagnóstico más óptimo y de bajo costo al imitar fragmentos estructurados de proteínas de membrana celular de la bacteria con el fin de mejorar el reconocimiento de la misma aplicando técnicas de ELISA

PROBLEMA

Numerosas enfermedades que se dan a nivel del trópico son poco conocidas y a la vez las investigaciones para generar nuevas maneras de diagnosticarlas son escasas, provocando así un retraso en los tratamientos oportunos. Una adecuada difusión de información sobre esta enfermedad puede prevenir los casos de contagio, sin embargo cuando ya es inminente la infección por el patógeno ¿Es posible usar péptidos con restricción conformacional para aumentar en gran medida la reacción antígeno-anticuerpo en sueros de pacientes con Leptospirosis y de esta manera lograr el reconocimiento oportuno del patógeno para agilizar los procesos de tratamiento en los pacientes?

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, según datos del Boletín epidemiológico semanal del Instituto Nacional de salud y teniendo como referencia casos de Leptospirosis del año 2015 se ha documentado un incremento del 13.94% en los casos de contagio. Los departamentos con mayor incidencia de casos confirmados como positivos para marzo de 2014 son Antioquia, distrito de Barranquilla, Bogotá, Bolívar, Boyacá, Cartagena, Cauca, Cesar, Chocó, Córdoba, Cundinamarca, Huila, Magdalena, Meta, Norte de Santander, Quindío, Risaralda, Santander, Santa Marta, Sucre, Tolima y Valle del Cauca por lo que se ha convertido en un problema de salud pública, que ha ido en aumento de enero con un registro del 0.015% a marzo con un registro del 0.25% de casos. (Instituto Nacional de Salud, 2014)

En las zonas rurales se reconocen casos de contagios con serotipos de la bacteria que pueden infectar a gran parte de la población por contacto con aguas contaminadas en épocas del año en que las condiciones son óptimas para el desarrollo de la bacteria. Los diagnósticos de la enfermedad son difíciles de confirmar ya que no es una enfermedad muy estudiada y tomada en la mayoría de los casos como irrelevante por lo tanto no se realizan las pruebas de laboratorio específicas para el reconocimiento de la bacteria; además suele ser confundida con otras patologías como influenza, meningitis, hepatitis, dengue o fiebres virales hemorrágicas debido a la sintomatología que presenta lo que conlleva a un descuido o implementación errónea de tratamientos que en ocasiones complican la enfermedad. (Organización Mundial de la Salud, 2008) Es necesario generar nuevos métodos de diagnóstico más específicos que permitan un reconocimiento inmediato del microorganismo para que de esta manera el tratamiento se aplique con anticipación y se eviten complicaciones. Los péptidos con restricción conformacional permiten el reconocimiento de anticuerpos en sueros y si además imitan epítopes de la proteína nativa son mucho más sensibles, por lo tanto al emplear este mecanismo en pruebas serológicas puede favorecer el diagnóstico de enfermedades y en este caso específicamente de Leptospirosis. Investigaciones recientes, han demostrado el aumento en la reacción antígeno-anticuerpo debido al uso de los péptidos con restricción conformacional (Calvo et al., 2003; Calvo & Satterthwait, 2005).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar fragmentos en antígenos de superficie de *Leptospira interrogans* que al ser sintetizados favorezcan el reconocimiento de anticuerpos en sueros de pacientes con Leptospirosis.

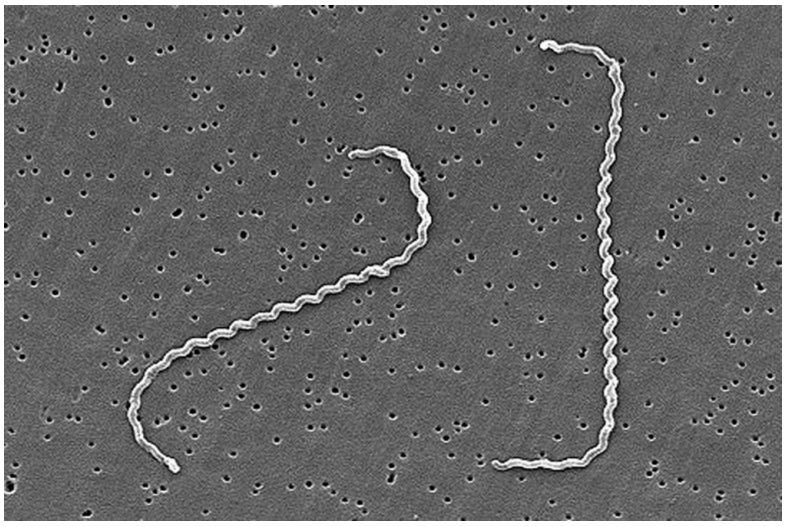
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los principales antígenos de superficie de *Leptospira interrogans*.
- Analizar las estructuras de cada antígeno en búsqueda de fragmentos que puedan ser reconocidos por el sistema inmune.
- Diseñar péptidos candidatos a ser sintetizados que imiten la estructura de estos fragmentos.

CAPÍTULO 1: LA LEPTOSPIROSIS Y EL AGENTE ETIOLÓGICO

La leptospirosis es una enfermedad que actualmente se encuentra en gran parte de las zonas rurales de países tropicales y que es causada por una espiroqueta perteneciente al orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae y género Leptospira; éstas, son bacterias Gram negativas con cuerpo citoplasmático helicoidal y un axostilo que va dispuesto en forma de espiral inserto en un extremo de la leptospira para favorecer su movilidad, rodeando ambas estructuras se encuentra una membrana que protege al microorganismo. Al ser observadas empleando microscopía de campo oscuro las leptospiras miden entre 20 y 30 um de largo por 0.2-0.3 um de ancho y presentan una extremidad terminada en gancho sin embargo, son tan delicadas que aparentemente se ven como una cadena de cocos diminutos ya que no se tiñen con facilidad. (Laguna, 2000) (Ver figura 1)

Figura 1. Imagen de *Leptospira interrogans* obtenida por microscopía electrónica (Obtenida del CDC public Health Image Library)



Estos individuos sobreviven en medios húmedos con presencia de oxígeno (aerobias), la temperatura promedio que favorece su reproducción oscila entre los 20 y 37 grados centígrados, sin embargo se ha demostrado que a temperaturas de -20 grados centígrados entran en latencia y sobreviven, así mismo, las leptospiras requieren de un pH entre 6 y 8 ya que no toleran el medio ácido. Una vez encuentran un hábitat ideal como pueden ser fuentes de agua dulce estancadas, llegan a sobrevivir cerca de 180 días (Laguna, 2000) y en lodos cerca de 1 año. (García, Reyes, Basilio, Ramírez, & Rivas, 2013).

Son fácilmente cultivables en medios artificiales como lo son Fletcher y Korthoff los cuales manejan como base suero de conejo diluido, agar, peptona, caldos simples y sales,una vez sembradas las colonias crecen mejor en presencia de oxígeno y a una temperatura de 30 grados centígrados formando así sectores redondos de 1 a 3 mm de diámetro entre 6 y 10 días. (Laguna, 2000).

Las especies de leptospira se pueden clasificar en dos grandes grupos (patógenas y saprófitas) dependiendo la relación que establezcan con las poblaciones humanas. Entre las cepas patógenas se encuentran aquellas asociadas a *Leptospira interrogans,* un grupo que cuenta con aproximadamente 200 variedades diferentes distribuidas en 23 grupos (Zunino & Pizarro, 2007), las patógenas que se han caracterizado principalmente por pequeñas variaciones en los lípidos y polisacáridos presentes en las membranas celulares que son reconocidos en las pruebas serológicas y permiten su clasificación en serogrupos y posteriormente en serotipos (González, Rodríguez, Batista, Valdés, & González, 2003) pero gracias a técnicas de hibridación de ADN se han logrado clasificar en siete especies patógenas principales: *L. borgpetersenii, L. inidai,* ***L.interrogans****, L. Kirschneri, L.noguchii, L. santarosai y L. weilii.* (Martínez, 2000)*,* por otro

lado las especies saprófitas estan relacionadas con *Leptospira biflexa* y se encuentran con frecuencia en fuentes de agua, sin embargo no causan ningún problema a la hora de entrar en contacto con estas accidentalmente. (Ministerio de Salud, 2014).

Muchos serotipos predominan en hospederos seleccionados pero su distribución no es exclusiva, la misma especie puede ser reservorio de varios serotipos y puede ser portadora de serotipos que predominan en otros mamíferos. Los tres reservorios más comunes de la infección son: los que se encuentran en las ratas (*Leptospira icterohaemorrhagiae*), en los perros (*Leptospira canícola*) y la del ganado y cerdos (*leptospira pomona*). Secretaría de Salud (2012) Es por ello que esta enfermedad es considerada como una zoonosis ya que los principales hospederos de la bacteria son animales salvajes o domésticos que comparten su hábitat con poblaciones humanas. Adolf Weil, médico alemán, describió en el año 1886 por primera vez la patología demostrando que era transmitida por ratas desde allí su nombre es relacionado a la forma severa de leptospirosis por lo cual se le conoce también como Enfermedad de Weil, sin embargo hoy en día se considera preferible referirse como leptospirosis a todas las infecciones con cualquier cepa de leptospiras independientemente de los síntomas y signos clinicos. (Organización Mundial de la Salud, 2008).

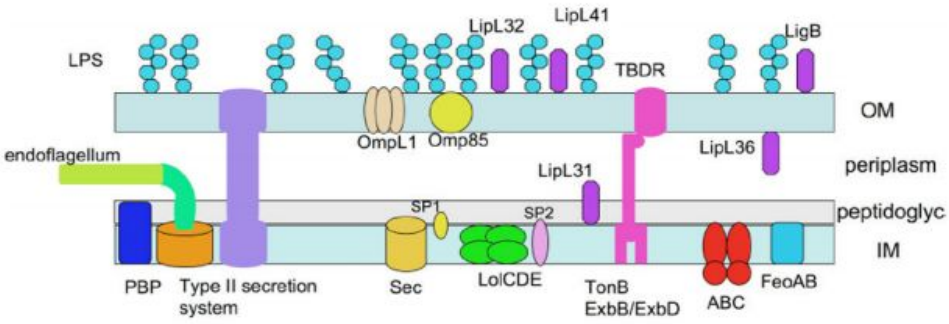
La Leptospira tiene una membrana celular rica en lípidos y lipopolisacáridos en la parte más externa que son altamente inmunogénicos lo que desencadena fácilmente la respuesta inmune del organismo infectado, además presenta lipoproteínas entre las que se destacan LipL32 y LipL41 y algunas porinas como OmpL1 y Omp85 muy conservadas y que son el sitio de interacción con el hospedero. (García, Reyes, Basilio, Ramírez, & Rivas, 2013) gracias a estas los anticuerpos pueden reconocer y eliminar los microorganismos.

Las OMP (Other Membrane Proteins) son importantes en la patogénesis de la enfermedad debido a que actúan como adhesinas siendo un punto de fijación con los anticuerpos (Murphy y Bartos, 1988; Saukkonen et ál., 1987) por su parte la lipoproteína LipL32 se encuentra de manera abundante en la membrana del patógeno (Ver Figura 2) lo que la hace importante dada su capacidad inmunogénica (Zuerner et ál,1991), demostrado en estudios recientes en donde LipL32 es el antígeno dominante en la respuesta inmune humoral a Leptospirosis en humanos, mostrando una mayor especificidad en pacientes que desarrollen la enfermedad en fase aguda o crónica (Flannery et ál., 2001; Guerreiro et ál., 2001). En un estudio realizado en 1991 por Haake et al, se demostró que ésta lipoproteína era expresada de manera constante en diferentes cepas de *Leptospira interrogans* lo cual puede representar una ventaja a la hora de reconocer la enfermedad sea cual sea el serovar causante.

Por su parte la lipoproteína LipL41 se expresa de igual manera en la superficie de la membrana de Leptospira y actúa sinérgicamente con la OmpL1 (Haake et ál., 2000; Shang et ál., 1996). sin embargo se ha encontrado en menor proporción en los tejidos infectados por la bacteria lo que sugiere que esta proteína es fácilmente degradada por enzimas proteolíticas de las células (Barnett et ál., 1999). sin embargo es una proteína que al igual que la LipL32 se conserva en diferentes serovares de *Leptospira.* (Haake, 2004).

Figura 2: Esquema de la membrana celular de las Leptospiras

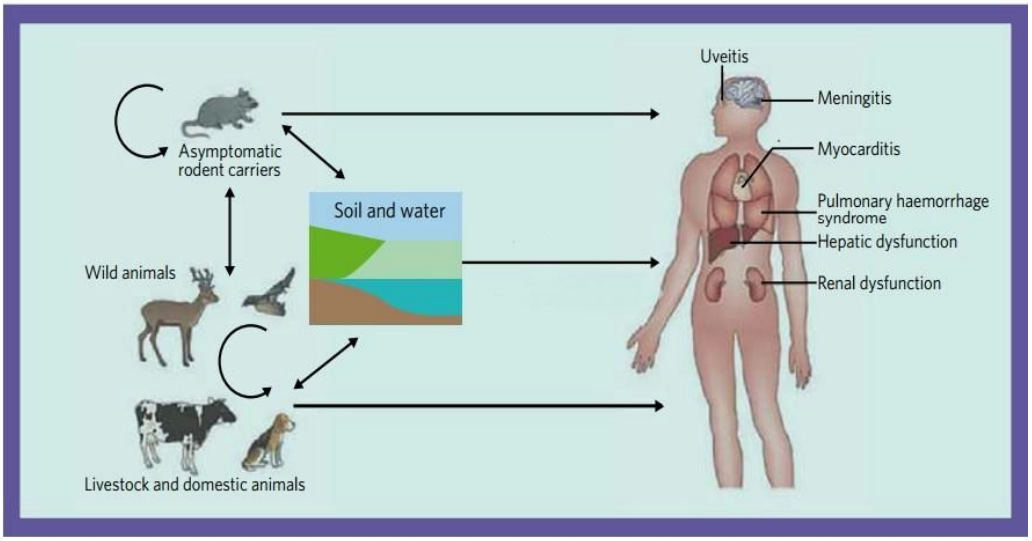
Recuperada de: Leptospira: The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen. (Ko et al, 2009)



En humanos, la transmisión del agente infeccioso ocurre a través de la piel o mucosas (intestinales, genitales, nasales, oculares) cuando estas entran en contacto directo con fluidos corporales de animales infectados como lo son la orina, líquidos placentarios o sangre entre otros, aunque, gracias a la capacidad de la bacteria de sobrevivir en aguas dulces, también hay probabilidades de contagio a la hora de consumir o nadar en aguas contaminadas. (Rodríguez, 2000) (Ver figura 3).

Figura 3: Diferentes modos de transmisión de Leptospirosis.

Recuperada de:Report of the First Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. (Organización Mundial de la Salud 2010)



El riesgo de contagio aumenta significativamente con las actividades laborales que requieran el manejo directo del reservorio dentro de las que se encuentran las las labores pecuarias, veterinarias o de personal de mataderos, así mismo, las probabilidades de contaminación al realizar este tipo de trabajos asciende a un 72,2 % con respecto a contagios bajo otras circunstancias. Se ha podido evidenciar gracias a estudios serológicos que los serovares más frecuentes fueron *hardjo* y *pomona* para el caso de personal que maneja ganado y veterinarios en general e *icterohaemorrhagie* y *ballum* para personal encargado de labores en los mataderos. (Zunino y Pizarro, 2007).

CAPÍTULO 2: EPIDEMIOLOGÍA

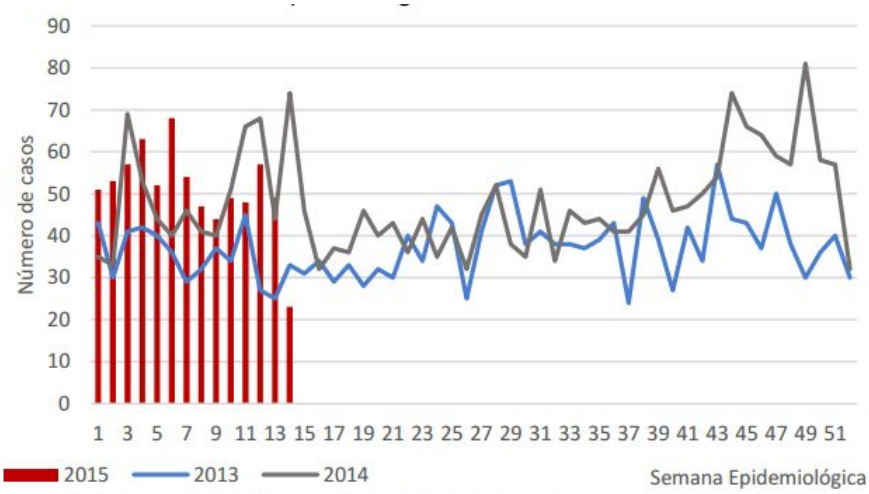
La leptospirosis tiene una amplia distribución a nivel mundial, principalmente en países tropicales y subtropicales en donde es considerada como endémica dado que el microorganismo causante sobrevive en condiciones húmedas y cálidas, sin embargo en países con estaciones suelen darse casos específicamente en verano y otoño cuando las condiciones higiénicas y ambientales favorecen la supervivencia del patógeno. (Zunino y Pizarro, 2007).

Numerosos factores ambientales, sociales y económicos son determinantes en la presentación de casos y brotes epidémicos no sólo de Leptospirosis sino además de otras enfermedades infecciosas tales como la influenza o el dengue ya que son más frecuentes por ejemplo, durante desastres naturales como inundaciones o periodos de lluvias intensas. Además la urbanización, la deficiencia en el saneamiento ambiental, la acumulación descontrolada de basura que permitan la proliferación de roedores y la presencia de animales de producción o domésticos sin control sanitario constituyen el ambiente ideal para el desarrollo de un escenario propicio que desate un grave problema de Salud Pública. (Ministerio de Salud, 2014).

En muchos países, la notificación de casos de leptospirosis no tiene carácter obligatorio lo que puede repercutir a la hora de registrar datos de los casos presentados en diferentes regiones del planeta debido a la dificultad en el acceso a las pruebas de diagnóstico y el desconocimiento de la enfermedad en todas sus áreas (manejo, cuadro clínico, diagnóstico, tratamiento), lo que resulta en un subregistro de casos y sesgos en la información. (Bello et ál, 2013).

En Colombia los casos de leptospirosis son evaluados por el Instituto Nacional de Salud, desde el año 2007 de manera obligatoria (Pulido et ál, 2014) posteriormente se informan mediante el Boletín Epidemiológico Semanal los datos obtenidos en las diferentes regiones del país; el primer diagnóstico de esta enfermedad en humanos se reportó en la ciudad de Barranquilla en el año 1995, afectando aproximadamente a 50 personas en su mayoría niños provenientes de barrios de bajos recursos en donde los niveles de salubridad eran mínimos (Macías et ál, 2014) para el año 2015 se han informado 14 semanas de las cuales las últimas dos han reportado un aumento del 1,51% en casos confirmados de Leptospirosis en el territorio nacional, ya que para la semana 13 habían 704 casos positivos y para la semana 14 aumentó a 715 casos.(Instituto Nacional de Salud, 2015) Sin embargo, al comparar los casos presentados para este año con los casos presentados en los años 2013 y 2014 se puede evidenciar una disminución en la frecuencia de casos como se observa en la gráfica 1 (Ver gráfica 1).

Gráfica 1: comportamiento de la notificación de leptospirosis, Colombia, Semana epidemiológica 14 de 2015 (Instituto Nacional de Salud, 2015)

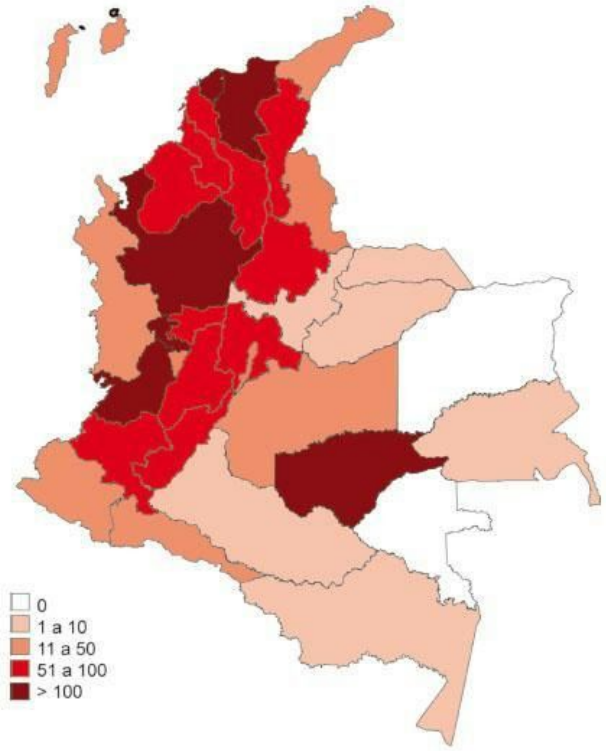


Fuente: Sivigila, Instituto Nacional de Salud. Colombia

Los reportes proceden de 32 regiones en todo el país teniendo una mayor concentración en los departamentos del Valle del Cauca (en donde hay mayor presencia de la enfermedad), Antioquia y Tolima (ver figura 4). Sin embargo los casos confirmados por pruebas de laboratorio no superan el 18,46% del total de casos. Por ser una patología que presenta cuadros clínicos variantes y similares a otras enfermedades, ha tenido poca atención por parte de equipos médicos a la hora de ser diagnosticada mediante pruebas que confirmen la presencia del agente infeccioso (Zunino y Pizarro, 2007).

Figura 4: Reportes departamentales de casos por Leptospirosis

Recuperada de: Revista Biomédica. Instituto Nacional de Salud. Volumen 33 2013



Hasta lo que lleva corrido el año 2015 “se han notificado 25 casos probables de muertes por leptospirosis en Colombia los cuales siete proceden de Antioquia, tres de Bolívar, dos de Sucre, dos de Tolima, dos de Valle de Cauca y una muerte respectivamente de Cauca, San Andrés, Risaralda, Bogotá, Arauca, Meta, Choco, Córdoba y Quindío.” (Instituto Nacional de Salud, 2015).

La leptospirosis además de causar problemas de salud pública, también influye negativamente en la economía de los países de donde es endémica ya que compromete la salud de animales tales como bovinos y porcinos quienes desarrollan los síntomas característicos de la enfermedad al no ser huéspedes adaptados, por otro lado en animales que son reservorios de la leptospira suelen presentarse problemas de infertilidad (Ochoa, Sánchez y Ruíz, 2000).

CAPÍTULO 3: PATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA

La bacteria causante de las diferentes formas de Leptospirosis tiene como punto de acumulación en sus hospederos naturales el lumen de los túbulos renales, de donde pasa a la orina (esta secreción recibe el nombre de leptospiruria) y debido a esto se elimina la bacteria al ambiente. (García, Reyes, Basilio, Ramírez, & Rivas, 2013). Aquí empieza su ciclo vital hasta encontrar un reservorio, por el cual ingresa, generalmente, por la piel o vía mucosa hasta el tejido sanguíneo en donde se difunde rápidamente; pasadas 48 horas desde la exposición se puede encontrar en todos los tejidos y órganos del nuevo huésped, teniendo como preferencia Los riñones, el hígado, el corazón y el músculo esquelético. (Baselli, 2014) Una vez alojada, tiene un periodo de incubación entre 4 a 10 días en el cual se multiplica rápidamente y continúa su diseminación por todo el organismo, para el caso de madres contaminadas, la Leptospira atraviesa la placenta hasta llegar al embrión en donde puede causar graves reacciones entre ellas, malformaciones, aborto o leptospirosis prenatal.

Una vez se inicia la respuesta febril del cuerpo, el microorganismo ya maduro suele migrar a la sangre periférica y aislarse allí hasta que cesa la fiebre (Gasque, 2008) y no es fagocitada ni atacada por polimorfonucleares y macrófagos ya que es resistente a su acción y si estos no son específicos (lo cual ocurre en las fases iniciales de la acción inmunológica) no hay reconocimiento de la misma (Baselli, 2014).

Pasados 6 días después del contagio se observa el desarrollo de anticuerpos específicos en la sangre y la bacteria suele hallarse en la orina del paciente (Gasque, 2008) Por acción inmunológica el microorganismo es opsonizado y eliminado de la sangre y la orina; esta fase es

conocida como fase inmune o de leptospiruria que suele ser la etapa más contagiosa de la patología (Baselli, 2014).

No se ha podido demostrar con exactitud el mecanismo que emplea la bacteria para su acción patógena, sin embargo, en cultivos se ha demostrado la presencia de un lipopolisacárido tóxico que provoca un daño celular generalizado, así mismo, las toxinas producidas por la necrosis celular pueden ser las causantes del daño en tejidos y órganos. También se ha encontrado que las Leptospiras en interacción con células cultivadas *in vitro* producen hemolisinas que a su vez son causantes de daño en el tejido vascular (endotelio) causando vasculitis y hemorragias, ya que se ve favorecido su ingreso a la célula. (Carrada, 2005).

Específicamente el serotipo Icterohaemorrhagiae es el principal causante de la forma más agresiva y letal de leptospirosis también conocida como enfermedad de Weil en donde la respuesta inmune del hospedero generalmente ocurre a las dos semanas de la exposición y se caracteriza por un proceso inflamatorio del sistema nervioso central dado a que hay estudios que demuestran una reacción cruzada de los anticuerpos en contra de tejidos del hospedero entre los cuales se encuentra el tejido ocular y células como las plaquetas; además se ha encontrado que hay probabilidades de que una vez fagocitada la bacteria, ésta provoque apoptosis en los linfocitos y por lo tanto una reducción de linfocitos CD4. (García, Reyes, Basilio, Ramírez, & Rivas, 2013).

El desarrollo de la forma letal de leptospirosis suele ser la principal causa de muertes en los pacientes contagiados debido a que los síntomas empeoran con el tiempo y desarrollan otras complicaciones. el paciente que presenta esta forma de leptospirosis presentan una elevación de

la temperatura que sobrepasa los 40° C que provoca daño en la red vascular capilar del hígado, severos disturbios en la coagulación, hemorragias generalizadas, deshidratación seguida por hipotensión y falla renal. Posteriormente, en la segunda semana de evolución de la patología ya se evidencia una retención de productos tóxicos en la sangre (Uremia) debido a la falla renal que se expresa en la disminución de la producción de orina (Oliguria) que se puede controlar sometiendo al paciente a diálisis de por vida. (Carrada, 2005).

La leptospirosis pude manifestarse en tres formas distintas: subclínica, anictérica (benigna) y grave con ictericia (Enfermedad de Weil) (Zavala et ál, 1998) Esta clasificación se da teniendo en cuenta la manifestación de la enfermedad y el grado en el que los órganos se ven comprometidos. Usualmente la aparición de los síntomas se da después de un periodo de 7 días de incubación del microorganismo y suelen desencadenar un cuadro clínico agresivo que incluye calofríos y compromiso agudo del estado general del paciente. Sin embargo, en algunos casos la enfermedad es asintomática en sus estado iniciales agravándose con el paso del tiempo cuando ya los tejidos han sido afectados.

Los síntomas más comunes dentro del cuadro clínico propio de la leptospirosis incluye cefaleas, fiebre y dolor articular y muscular entre otros, mostrando gran similitud con otras enfermedades infecciosas (bacterianas, virales y parasitarias); sin embargo, son los signos los que permiten poner en sospecha el caso, ya que dan evidencia del daño en órganos como el hígado (al desencadenar ictericia), del sistema nervioso central al mostrar inflamación de las meninges, del sistema urinario que se manifiesta con una falla renal y en general en otros sistemas, por la presencia de hemorragias debido al daño en el tejido vascular. (Zunino y Pizarro, 2007).

El tratamiento más común suele darse con antibióticos como la penicilina y sus derivados los cuales favorecen en la disminución de los cuadros febriles y las complicaciones en otros sistemas, sin embargo estos son efectivos sólo si se suministran en la primera semana de evolución de la enfermedad. (Carrada, 2005) de allí la importancia de un diagnóstico oportuno y confiable.

CAPÍTULO 4: MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Muchas de las enfermedades son diagnosticadas clínicamente gracias a la sintomatología que desarrollan, sin embargo, uno de los principales problemas para el diagnóstico de Leptospirosis es la similitud con otras enfermedades tropicales como el Dengue o la Malaria a la hora de manifestarse (Macías el ál, 2004). Con base en esto, en México (Zavala et al. 1998) propuso un estudio para comparar los cuadros clínicos presentados por numerosos pacientes que presentaban Dengue y Leptospirosis, observándose, que no se podía llegar a un diagnóstico preciso con los signos y síntomas sino que por el contrario, esta enfermedad debe ser corroborada con ayuda de pruebas de laboratorio específicas que permitan definir el tipo de microorganismo causante de la patología. (Zavala et ál, 1998).

A partir de ello, los casos de leptospirosis se clasifican según su confirmación en: sospechoso, cuando el paciente refiere signos y síntomas asociados a dolor muscular (mialgias), conjuntivitis, erupción cutánea, dolor en las articulaciones (artralgias), vómito, dolor abdominal, diarrea, entre otros, además el paciente señala antecedentes epidemiológicos con al menos 30 días de anterioridad, esto quiere decir que hubo probablemente contacto con animales infectados,

basuras, aguas estancadas o actividades de riesgo laboral como la ganadería y la agricultura. (Instituto Nacional de Salud, 2014).

Los casos descartados son entonces aquellos que se han analizado en laboratorio y arrojan como resultado un negativo para anticuerpos específicos.(Instituto Nacional de Salud, 2014) En Colombia, la confirmación de los casos de leptospirosis en humanos se da empleando técnicas de serología e histopatología que realiza el Instituto Nacional de Salud y por serología en los Laboratorios Departamentales de Salud Pública (LDSP). Otras entidades como el Instituto de Medicina Tropical de Medellín, el CIDEIM en Cali, y el Centro Integral de Diagnóstico Agropecuario en Pereira, también apoyan el diagnóstico serológico en humanos. Para el diagnóstico en animales, el ICA lleva a cabo las dos pruebas antes nombradas y el CORPOICA únicamente emplea la serología. (Carrada, 2005) No obstante, han identificado deficiencias en la vigilancia de esta patología debido a que el acceso a las pruebas de diagnóstico es limitado y dificulta el seguimiento de los casos positivos trayendo como resultado subregistros y sesgos en la información (Bello et ál, 2013) además las pruebas diagnósticas en Colombia no detectan en su totalidad los serovares existentes en el país, es por ello que un diagnóstico negativo no indica la ausencia de la infección, además los resultados se pueden ven afectados por el tipo, el momento y la forma adecuada como se tome la muestra. (Carrada, 2005) Por ello que se deben proponer nuevas vías de reconocimiento del patógeno más sensibles y que incluyan estructuras moleculares encontradas en todos los serovares con el fin de diagnosticar rápidamente y aprovechar al máximo la muestra obtenida.

MÉTODOS DIRECTOS

CULTIVOS

La efectividad de las muestras tomadas para el diagnóstico de Leptospirosis depende de la etapa de la infección. Usualmente las leptospiras circulan en la sangre del paciente pasados 10 días aproximadamente desde el inicio de la enfermedad, así mismo pueden aparecer en otros fluidos corporales como la orina y líquido cefalorraquídeo los cuales pueden representar un buen material a la hora de realizar cultivos de los microorganismos. Sin embargo las leptospiras crecen muy lentamente y para el momento en que sean detectables en el cultivo, el paciente ya tendrá anticuerpos detectables en la serología, es por ello que este método de diagnóstico no resulta eficaz en la fase temprana de la enfermedad, pero si resulta apropiado para el estudio de las diferentes serovariedades y a su vez el reconocimiento de su estilo de vida.(Secretaría de Salud, 2012).

La orina, las muestras postmortem de los órganos más afectados y el líquido cefalorraquídeo son en su mayoría empleados para la obtención del microorganismo para de esta manera realizar su cultivo. Las leptospiras mueren rápidamente en la orina, es por ello que este método es valioso sólo si se puede obtener una muestra limpia y la inoculación del microorganismo en el medio se hace antes de las dos horas contadas a partir de la recolección de la muestra, lo mismo ocurre con las muestras postmortem las cuales deben ser obtenidas asépticamente y tan pronto como sea posible después de la muerte, así mismo se debe realizar un barrido del mayor número de órganos posibles y realizar el cultivo inmediatamente. (Secretaría de Salud, 2012) sin embargo, si las muestras deben ser transportadas al lugar en donde serán

analizadas, se deben conservar a 4°C para prevenir la muerte celular y por lo consiguiente la disminución del pH que tendrá como efecto la muerte de las leptospiras. (Organización Mundial de la Salud, 2008). Los cultivos realizados con líquido cefalorraquídeo por su parte, se obtienen gracias a la punción lumbar y se realiza cuando se sospecha de meningitis debido a lo síntomas que incluyen cefalea intensa, fotofobia, visión borrosa, alteración del estado mental y rigidez en la nuca que suele ser el síntoma más común en estos casos. (Su y Mayorga, 2009).

Para el análisis de los cultivos obtenidos, se hace uso de la microscopía de campo oscuro que permite observar las leptospiras como microorganismos delgados, enroscados y con movimientos rápidos (Secretaría de Salud, 2012) Esta prueba requiere de técnicas especiales para el reconocimiento del patógeno ya que suele ser difícil en particular cuando están presentes en poca cantidad, también la contaminación de las muestras con fibras puede favorecer a la confusión con el espécimen a reconocer y conlleva a resultados falsos positivos. (Organización Mundial de la Salud, 2008).

TÉCNICA DE PCR

Al emplear esta técnica se pueden amplificar segmentos específicos del ADN de Leptospiras y usualmente se obtiene en las muestras de sangre, es por ello que puede ser una buena opción para el diagnóstico ya que puede confirmar la enfermedad en etapas tempranas pues si la bacteria se encuentra presente, así mismo su información genética es detectable. (Secretaría de Salud, 2012) Pero, esta técnica requiere de equipos especializados y personal altamente calificado que realice la purificación de la muestra con el fin de que no se contabilicen otras moléculas y surjan resultados falsos positivos, también es importante resaltar que las

posibilidades de falsos negativos son amplias si hay presencia de inhibidores en los materiales clínicos tales como anticoagulantes. (Organización Mundial de la Salud, 2008).

MÉTODOS INDIRECTOS

INMUNOQUÍMICA

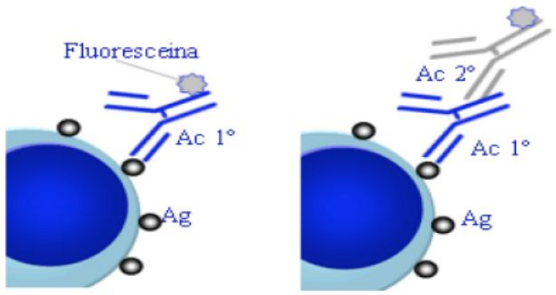
Cuando una molécula extraña ingresa al organismo, el sistema inmunológico se activa y los linfocitos empiezan a segregar cierto tipo de proteínas denominadas anticuerpos que son capaces de reconocer y unirse a este "cuerpo extraño" o también llamado antígeno con el fin de marcarlo y favorecer luego su fagocitosis por parte de los macrófagos. Los anticuerpos se unen a su antígeno a través de determinadas zonas de su estructura que reciben el nombre de *epitopos***.** (Ramírez et ál, s,f) Las técnicas inmunoquímicas se basan en este mecanismo de acción del sistema inmunológico para producir anticuerpos contra un variado grupo de macromoléculas, la gran especificidad de estos anticuerpos al unirse a antígenos los ha convertido en candidatos óptimos en el reconocimiento, estudio y cuantificación de microorganismos, virus y parásitos en solución o a nivel celular; es por ello que estos análisis se emplean actualmente en la mayoría de los laboratorios para el diagnóstico de enfermedades (Calderón, 2007).

Entre las pruebas más comunes, empleadas para el diagnóstico de Leptospirosis tanto en humanos como en animales se encuentran la inmunofluorescencia, la cual consiste en la marcación de la reacción inmunológica (ANTÍGENO-ANTICUERPO) con un componente fluorescente que al ser irradiado con luz ultravioleta absorbe la longitud de onda más corta y la convierte en una longitud de onda más larga con menor energía. (Calderón, 2007).

Este proceso se inicia incubando el antígeno con un anticuerpo específico previamente preparado frente a la proteína que se quiere detectar y se fijan a un cubreobjetos. Este anticuerpo puede estar marcado inicialmente con la molécula fluorescente (fluoresceina) a lo que se le denomina técnica de inmunofluorescencia directa. Sin embargo, debido a que la técnica directa tiene limitación para el marcaje de cada uno de los anticuerpos necesarios a la hora del reconocimiento de las sustancias que se van a investigar, se emplea otra técnica denominada indirecta en donde una molécula conocida como anti-anticuerpo (que pueden ser anti-inmunoglobulinas, o moléculas afines al anticuerpo) es marcada con el fluoruro para que reconozca el complejo antígeno-anticuerpo y lo revele bajo un microscopio con luz UV. (Calerón, 2007) (ver figura 5).

Figura 5: Inmunofluorescencia directa (izquierda) e Inmunofluorescencia indirecta (derecha). Ag hace referencia al antígeno de estudio y Ac a los anticuerpos específicos.

Imagen Recuperada de (Calderón, 2007)



Este tipo de pruebas se adaptan más a las condiciones de laboratorios en Colombia, sin embargo su eficacia depende del número de microorganismos presentes en el tejido, lo que en etapas tempranas de la enfermedad representaría problemas para el diagnóstico oportuno. (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2008).

SEROLOGÍA

La serología se basa en métodos que aprovechan la capacidad de un organismo para defenderse ante una infección por un patógeno, ya que el sistema actúa frente a este generando mecanismos de reconocimiento eficientes que eviten en el futuro una nueva contaminación, es así es como se adquiere la inmunidad a este tras la exposición. Los test serológicos aprovechan esta serie de fenómenos fisiológicos entre los que se destacan además, las reacciones entre antígenos-anticuerpos, el sistema de complemento que mide la presencia de 20 grupos de proteínas que se activan tras la formación del complejo antígeno-anticuerpo y provocan estimulación en las membranas celulares con el fin de alterar su estructura o favorecer su destrucción, la precipitación y la aglutinación de células dependiendo sus características físicas y químicas entre otras. (Hofle y Blanco, s,f).

Estos métodos representan la manera más apropiada para diagnosticar etapas avanzadas de enfermedades infecciosas dado que si ya ha pasado tiempo suficiente para la generación de anticuerpos específicos por parte del sistema inmune del paciente, estos se pueden medir. Sin embargo, para el caso de la leptospirosis la vigilancia serológica provee información de esta como infección y no como enfermedad, debido a que la detección de anticuerpos que realiza no es específica y no indica que haya presencia del patógeno objetivo pues en el suero pueden persistir anticuerpos generados por otras infecciones (Secretaría de Salud, 2012).

Las técnicas más usadas para el diagnóstico de leptospirosis son las de microaglutinación y las Enzyme-linked immunosorbent assay ó ELISA por sus siglas en inglés. A continuación se

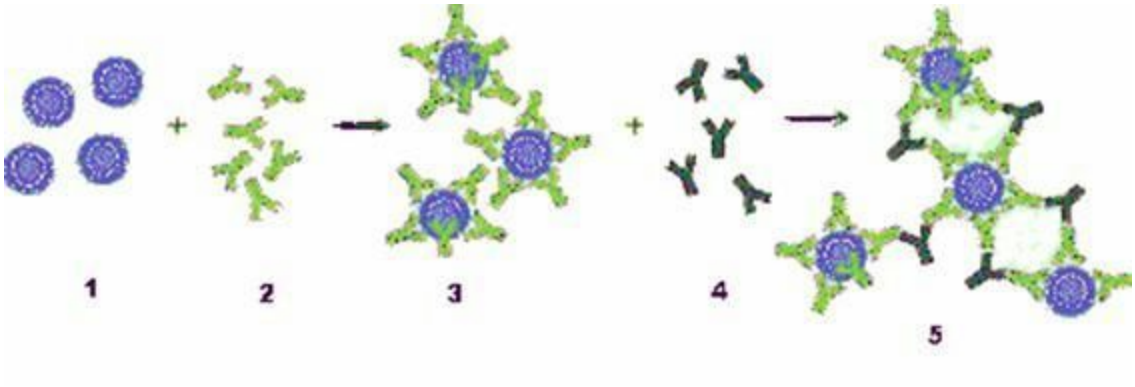
muestra una explicación de cada una además, las ventajas y desventajas que presentan a la hora del diagnóstico oportuno de la patología.

MICROAGLUTINACIÓN (MAT)

Las técnicas de microaglutinación MAT es considerada la prueba de referencia internacional por la Organización Mundial de la Salud para el diagnóstico de enfermedades de tipo bacteriano y se fundamenta en la agrupación de células o partículas de gran tamaño por acción de sustancias que las inducen. Para el caso de las pruebas usando el complejo antígeno-anticuerpo, la aglutinación es producida por los anticuerpos cuando los antígenos se han unido artificialmente a superficies como lo es la de glóbulos rojos, plaquetas, leucocitos o partículas de látex. Para el caso de aglutinación empleando glóbulos rojos como sustrato, se le denomina prueba de hemoaglutinación y para el caso del uso de partículas de látex se le denomina microaglutinación. Esta segunda, emplea las superficies artificiales para unir los antígenos, posteriormente, se añade anticuerpo que al ingresar reconoce la molécula específica y la atrae como lo haría en los procesos inmunológicos, de esta manera se agrupan los complejos afines y se evidencian debido al precipitado que forman. (Calderón, 2007) (Ver figura 6).

Figura 6: Aglutinación de antígenos adheridos a una superficie artificial por acción del reconocimiento por parte de los anticuerpos

Imagen recuperada de: (Coto, 2009)



En Colombia se han identificado cinco serovares que pueden ser diagnosticados empleando la prueba de microaglutinación entre los que se encuentran: *L. hardjo, pomona, canicola, icterohaemorrhagiae, y grippotyphosa.* (Carrada, 2005).

Aunque esta prueba tiene una sensibilidad adecuada, no tiene la capacidad de discriminar las diferentes clases de inmunoglobulinas por lo que para su adecuada interpretación se requiere la toma de varias muestras en un intervalo de 15 a 20 días especialmente en zonas de donde es endémica (Carrada, 2005) además es una prueba de alto costo al requerir el mantenimiento de cultivos con diferentes tipos de leptospiras para observar la sepa que reacciona con el suero del paciente, y el diagnóstico sería tardío (Organización Mundial de la Salud, 2008).

Otro obstáculo que puede presentar la prueba, es la presencia de anticuerpos específicos para otras serovariedades de Leptospira en el suero del paciente que generalmente reaccionan de manera cruzada con especies ajenas a la infectante. Es frecuente que esta prueba no pueda distinguir entre infecciones que ya han ocurrido de infecciones actuales es por ello que se deben realizar varias tomas como antes se mencionó para reducir este margen de error. (Organización Mundial de la Salud, 2008).

ELISA

Para evidenciar las reacciones antígeno-anticuerpo se ha propuesto una técnica que emplea marcadores para revelar dichas uniones, la técnica de Enzyme Linked Immuno Sorbent Sorbent Assay también conocida como ELISA por sus siglas en inglés se basa en el uso de una enzima que cumple esa función de marcador al conjugarse con un ligando que puede ser o el antígeno o el anticuerpo a estudiar, el componente marcado con la enzima es absorbido sobre un soporte sólido que garantiza la inmovilización de los complejos antígeno-anticuerpo formados, y por tanto, permite la cuantificación eficaz a la hora de añadir un sustrato que reacciona con la enzima y produce un cambio de coloración o una emisión de luz observable a simple vista en la muestra o cuantificable con el uso de un espectofotómetro. (Guzmán, 2004).

Las enzimas más usadas en los ensayos son: peroxidasa, fosfatasa alcalina, ß-galactosidasa, glucosa oxidasa, ureasa, glucoamilasa, acetilcolinesterasa, glutamato descarboxilasa y anhidrasa carbónica entre otras las cuales presentan gran actividad catalítica y además un alto número de cromógenos que permiten su lectura fotométrica.

Existen diferentes clasificaciones de la técnica ELISA que se basan en los principios de reacción que estos desarrollan, bajo este criterio se clasifican entonces en competitivos y no competitivos

ELISA NO COMPETITIVO O DIRECTO

Para la realización de la prueba se emplean placas que se tapizan con el anticuerpo específico frente al antígeno que se quiere determinar, este anticuerpo es llamado también primario debido a que permite el reconocimiento de biomoléculas específicas y tiene alta afinidad con porciones de estas (Epitopos), posteriormente se añade la muestra que contiene el antígeno (suero, orina u otros fluidos corporales) y finalmente se adiciona un anticuerpo secundario el cual tiene la capacidad de unirse a anticuerpos primarios o fragmentos de estos y

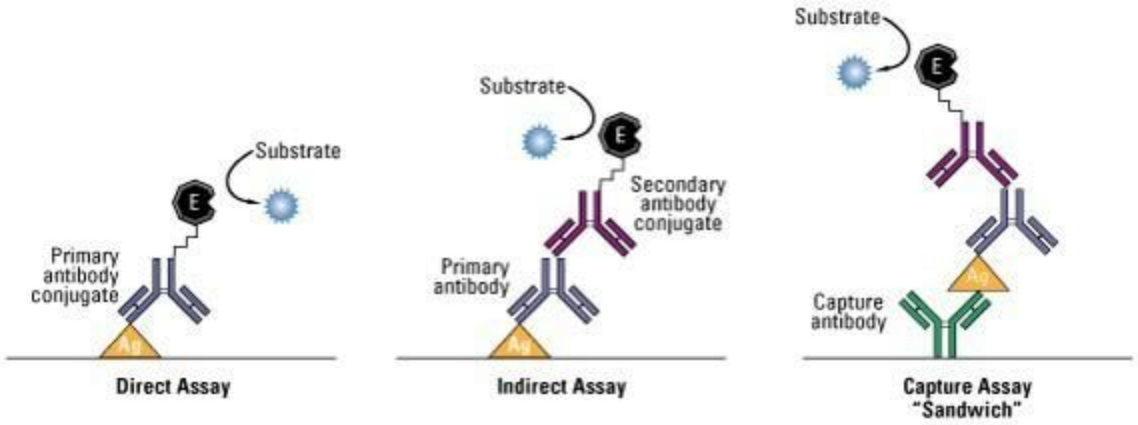
además son quienes portan la enzima que facilita el reconocimiento de los complejos formados una vez se añade el sustrato, los resultados obtenidos se cuantifican empleando un lector especialmente desarrollado para la técnica que maneja los principios de la espectrofotometría pues reconoce distintas longitudes de ondas producidas tras la emisión de luz UV sobre una muestra, esto permite al operador evidenciar indirectamente la cantidad de sustancia de interés presente en la muestra. (Calderón, 2007).

ELISA COMPETITIVO O INDIRECTO

En esta modalidad la muestra es incubada con los anticuerpos específicos permitiendo la formación de los complejos, pero en este caso las placas se tapizan con el antígeno de interés los cuales van a ser reconocidos previamente por los anticuerpos que no se unieron a los que estaban presentes en la muestra inicial. Esta técnica se emplea para la medida de hormonas, antígenos de la hepatitis y otras sustancias que se encuentran en bajas concentraciones. La enzima debe ir fijada al antígeno que se fija a la placa. (Calderón, 2007) (Ver figura 7).

Figura 7: Tipos de ELISA's

Imagen recuperada de:
www.lifetechnologies.com/co/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html



VENTAJAS DE LA TÉCNICA ELISA

Esta técnica presenta extraordinarias ventajas como lo son: la elevada sensibilidad, detectabilidad y especificidad a la hora de reconocer antígenos o anticuerpos en una muestra, los equipos empleados así como los reactivos para llevar a cabo el análisis son de fácil acceso dado que no manejan costos elevados, los procedimientos con la muestra suelen ser rápidos y sencillos arrojando resultados a tan solo horas de haber tomado la muestra y finalmente es una prueba con alta precisión cuando se emplean los anticuerpos o moléculas indicadas para cada caso. (Ochoa, 2012).

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULARES BASADOS EN ANTÍGENOS DE SUPERFICIE

Un gran número de estudios actuales se han centrado en el papel que cumplen las moléculas de superficie de los microorganismos en la inmunidad de los portadores, de igual manera esto ha favorecido al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico de las enfermedades infecciosas que se desencadenan. En *Leptospira interrogans* se ha observado gran predominancia de lipopolisacáridos y proteínas de membrana externa que se conservan de serotipo a serotipo,

las cuales pueden utilizarse para desarrollar productos recombinantes para serodiagnósticos. (Carrizo et ál, 2009).

Los péptidos sintéticos han encontrado importantes usos como drogas, para generar anticuerpos hacia sitios específicos de las proteínas, en métodos de diagnóstico y como posibles candidatos a vacunas; sin embargo, los péptidos en gran medida son desordenados en agua y no imitan bien los fragmentos estructurados de la proteína de donde provienen y por lo tanto no tienen buena afinidad con los anticuerpos generados por proteínas de virus/ bacterias o, inversamente, no pueden generar anticuerpos que tengan alta afinidad con las proteínas de donde provienen los péptidos. En la mayoría de estudios sobre la imitación de estas estructuras se trabaja principalmente de manera lineal, lo que presenta una baja sensibilidad de reconocimiento del antígeno es por ello que Con el fin de mejorar la actividad, los péptidos deben ser restringidos conformacionalmente para que imiten la estructura tridimensional del fragmento de donde provienen (Calvo y otros, 2003; Calvo y Satterthwait, 2005). "*Los anticuerpos generados al inocular péptidos estructurados, han demostrado reaccionar más eficientemente con las proteínas nativas, que los generados al inocular péptidos no estructurados"* (Cabezas,2000; Calvo, 1994 y 2003).

La identificación e imitación de epítopes es el principal objetivo en el desarrollo de vacunas y en el diagnóstico de enfermedades infecciosas (Calvo, y otros, 2003) por lo tanto mediante este trabajo se empleará este método para el reconocimiento de la bacteria causante de la leptospirosis *Leptospira interrogans* calculando e imitando epítopes de dos proteínas ya reconocidas en estudios anteriores y ubicadas membrana de la bacteria como lo son las lipoproteínas LipL32, LipL41 y la porina OmpL1. (Sakolvaree, y otros, 2007)

METODOLOGÍA

Previamente a la redacción del presente documento se llevó a cabo un proyecto con el fin de dar solución al problema inicialmente planteado, el proyecto fue financiado por la Escuela Militar de Cadetes "General José María Córdova" de la ciudad de Bogotá y permitió obtener la metodología y los resultados que a continuación se mostrarán. Como producto se obtuvo un artículo el cual se encuentra actualmente en proceso de publicación en la Revista Científica de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas y el cual es adjuntado al presente documento como APÉNDICE NÚMERO 1

Revisión bibliográfica

Se consultaron artículos de revisión, libros sobre infectología, artículos sobre investigaciones ya realizadas para el conocimiento de las proteínas de superficie de la bacteria, artículos sobre trabajos con péptidos estructurados entre otros con el fin de comprender el comportamiento del patógeno y de esta manera hacer una recopilación de información fundamental que nos permita dar solución al problema previamente planteado.

Antígenos de superficie de *leptospira interrogans*

Para conocer la secuencia y la estructura de las proteínas de superficie, se lleva a cabo una búsqueda en la base universal de datos de proteínas PDB (Protein Data Bank). En esta base aparecen las publicaciones de expresión, cristalización de fragmentos y la estrategia para hallar la estructura, ya sea por resonancia magnética nuclear (RMN) o por cristalografía de rayos X.

Cálculo de estructura de los antígenos.

Una vez obtenidas las secuencias en el PDB, se aplican en el programa I-TASSER, que es un servidor para el cálculo y predicción de estructuras secundaria y terciaria de proteínas. (Zhang, 2008)La duración del análisis realizado por el programa demora entre 1 y 3 días por proteína aproximadamente.

Análisis de la estructura

Las imágenes en 3D de las estructuras obtenidas en el servidor I-TASSER y las encontradas en el PDB se comparan buscando similitudes de los fragmentos expuestos con el fin de encontrar secciones más exactas. En este caso se usa el programa J-mol para el manejo de las estructuras reportadas en PDB y para las calculadas por I-TASSER existe una herramienta interna del mismo programa.

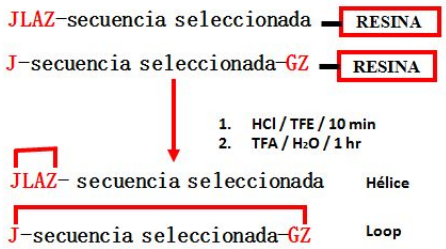
Selección de los fragmentos

Una vez obtenida la estructura terciaria, se analizan las subestructuras externas para seleccionar pequeños fragmentos de la proteína teniendo en cuenta la accesibilidad y definición de las estructuras que la conforman (hélices, hojas beta y loops).

Diseño de los fragmentos con restricción conformacional

Siguiendo la estrategia de Satterthwait (Calvo y Satterthwait, 2005). Para la síntesis de péptidos que imiten alfa-hélices, al final de la secuencia seleccionada se introduce el sitio de nucleación JLZ-, y para imitar loops la secuencia se introduce entre los ligandos J y Z (Ver Figura 8).

Figura 8. Estrategia de síntesis de péptidos con restricción conformacional.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El patógeno causante de leptospirosis presenta un gran número de proteínas, sin embargo existen dos lipoproteínas altamente inmunogénicas que fueron seleccionadas para el estudio: LipL32 y LipL41

Secuencia de los antígenos

En la base de datos PDB se encontraron las siguientes secuencias de aminoácidos para cada una de las proteínas:

Proteína LipL32:

MKKLSILAISVALFASITACGAFGGLPSLKSSFVLSEDTIPGTNETVKTLLPYGSVINYGYV
KPGQAPDGLVDGNKKAYYLYVWIPAVIAEMGVRMISPTGEIGEPGDGDLVSDAFKAAT
PEEKSMPHWFDTWIRVERMSAIMPDQIAKAAKAKPVQKLDDDDDGDDTYKEERHNKY

NSLTRIKIPNPPKSFDDLKNIDTKKLLVRGLYRISFTTYKPGEVKGSFVASVGLLFPPGIPG
VSPLIHSNPEELQKQAIAAEESLKKAASDATK

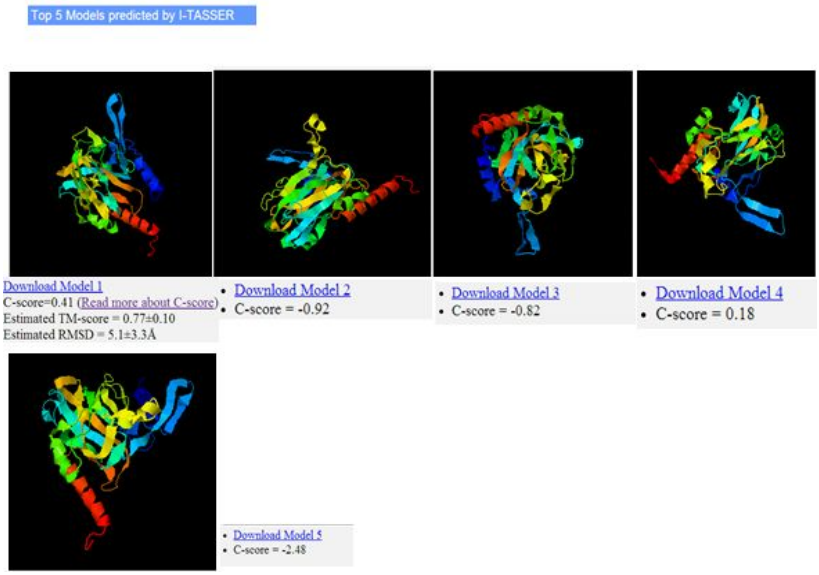
Proteína LipL41:

MRKLSSLISVLVLLMFLGNCAATVDVEYPVFPKDKEGRALQKFLGTIRNVGLAVEAPKK
SLWEAIFGEGSSFIDQMPSKVFEAFDKESYYKLTDLSKRADAINEASLSLTGITKNRAKIG
NLIGAEAILYIGYQKPYTECSTENKIDAVAAGLKVAGFAASMATGKDVNTGNEPVSKPT
GVRMMLIPLDATLIKVETGEVKKAVVSSPAKIFNSVGNLECPSILDSFGQGLDEAAAYIK
GRLSPIVKTERIKVFVKDEDEEVKELLQEGYEEIVGETPSFKKAKEAWEKADKKAKGQS
WGAKANLATYYFSTGDFEKSIKLYEEAMKLKDADKSYLRELRKRVEATFAVDESNAK

Cálculo de estructura terciaria de la proteína LipL32 por I-TASSER

El programa realizó una serie de cálculos e interacciones en redes neurales con datos de otras proteínas y halló 5 posibles estructuras de la proteína (Ver Figura 9) cada estructura tiene dos valores: el C-Score y el TM-Score. El primero determina la calidad de la predicción y se mide en un rango de -5 a 2, en donde un valor alto indica que la predicción es más cercana a la estructura nativa. El TM-Score es una medida de la semejanza estructural entre dos estructuras usadas como referencia para medir el modelo con respecto a una estructura nativa conocida (Zhang, 2008).

Figura 9: Modelos obtenidos en el cálculo de estructura terciaria de la lipoproteína LipL32 en el servidor I-TASSER

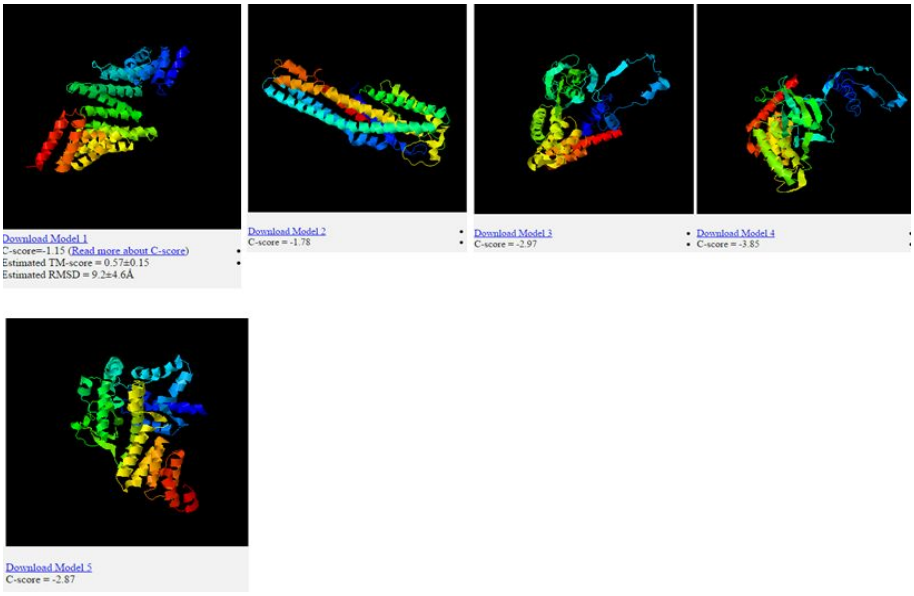


Para la selección del modelo con un mayor valor de confianza en la predicción, se tomó como base el C-Score, en donde el mayor valor es 0.40 y corresponde al modelo 1.

Cálculo de estructura terciaria de la proteína LipL41 por I-TASSER

Para esta proteína se procedió de la misma manera con el servidor I-Tasser; los cinco modelos que resultaron del cálculo presentaron los siguientes valores C-Score: modelo 1=-1.15, modelo 2= -1.78 Modelo 3=-2.97, Modelo 4= -3.85, Modelo 5=-2.87. (Ver Figura 10) Con base en estos datos, se escogió el modelo 1.

Figura 10: Modelos obtenidos en el cálculo de estructura terciaria de la lipoproteína LipL41 en el servidor I-TASSER.



Análisis de las estructuras

Al analizar la predicción obtenida por I-TASSER con la obtenida por estudios con difracción de rayos X en cristales de la proteína LipL32, se pudo corroborar que hay una gran similitud entre ambas y, por lo tanto, había un margen de confianza para estudiar la lipoproteína LipL41, aplicando solo la predicción, dado que no existe un estudio cristalográfico de la misma.

Para el análisis de la estructura y la selección de los fragmentos se tuvo en cuenta los siguientes factores:

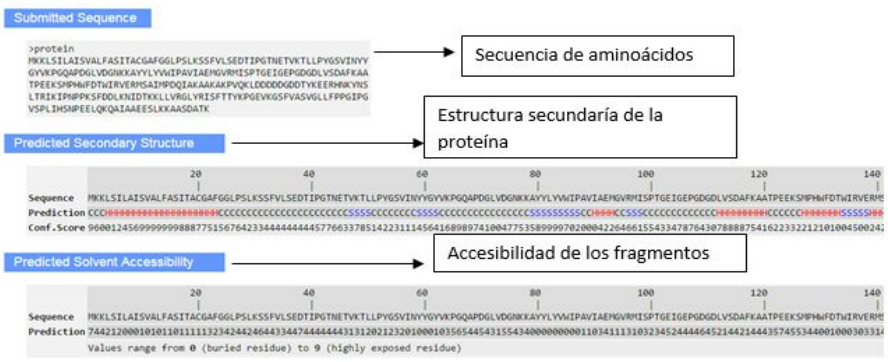
1. La accesibilidad de los fragmentos, es decir, que estén en la parte externa de la proteína y sean reconocidos fácilmente por el sistema inmune.
2. Que correspondan a subestructuras definidas, tales como hélices y Loops.

Selección de los fragmentos

Proteína LipL32

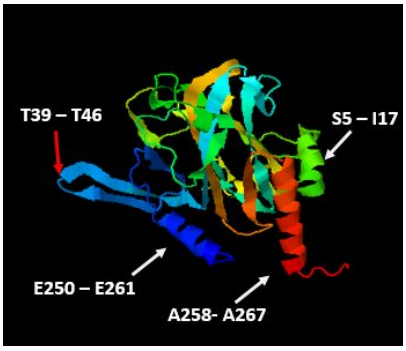
El servidor I-TASSER además de mostrar la predicción de la estructura terciaria de la proteína, también arroja la predicción para la estructura secundaria que es muy útil a la hora de seleccionar los fragmentos ya que muestra la posición de los aminoácidos dentro de la proteína. (Ver Figura 11) La accesibilidad de los fragmentos se califica en un rango de 0 a 9 en donde a mayor valor numérico, mayor la accesibilidad del fragmento.

Figura 11: Modelo de estructura secundaria y accesibilidad calculada por I-TASSER



Con base en esto se seleccionaron 4 subestructuras en la lipoproteína LipL32: 3 α-hélice comprendidas entre los aminoácidos Ser-5 e Ile-17 (SILAISVALFASI), Glu-250 y Glu-261 (ELQKQAIAAEE), Ala-258 y Ala-267 (AAEESLKKAA) y una loop entre Thr-39 y Thr-46 (TIPGTNET) (Ver Figura 12).

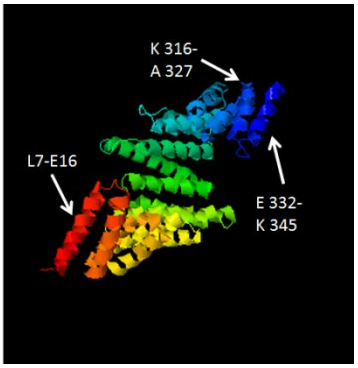
Figura 12: Secuencias seleccionadas a partir del análisis estructural de la proteína LipL32



Proteína LipL41

Siguiendo el mismo procedimiento se seleccionaron 3 secuencias para la lipoproteína LipL41, todas con una estructura de α-hélice. Leu-7 y Glu-16, Glu-332 y Lys-345, Lys-316 y Ala-327. (Ver Figura 13)

Figura 13: Secuencias seleccionadas a partir del análisis estructural de la proteína LipL41



Diseño de los péptidos con restricción conformacional

La actividad y función de las macromoléculas biológicas es fuertemente dependiente de su estructura y de las interacciones con su medio ambiente (Anfinsen, 1973). sin embargo, no siempre se cuenta con los datos de resonancia magnética nuclear o de cristalografía de rayos X

para la estructura de una proteína en particular, pero, afortunadamente, se cuenta con una gran cantidad de algoritmos, diseñados para predecir la estructura de una proteína. Con este fin, para el diseño de los péptidos se empleó la estrategia de Satterthwait (Calvo y Satterthwait, 2005), cuyos resultados ya han sido probados en otras enfermedades (Calvo y otros, 2003). En la tabla 1 se muestran los diseños basados en estas premisas, en donde para los péptidos con restricción conformacional a alfa-hélice el sitio de nucleación JLZ- se introduce después de la secuencia seleccionada y para el caso de las loops la secuencia se introduce entre los ligandos J y Z como se muestra.

Tabla 1. Péptidos diseñados

PROTEÍNA	POSICION	SECUENCIA	CONFORMACIÓN
LipL32	5-17	JLZ-SILAISVALFASI	Hélice
	250-261	JLZ-ELQKQAIAAEE	Hélice
	258-267	JLZ- AAEESLKKAA	Hélice
	39-46	J- TIPGTNET-Z	Loop
LipL41	7-16	JLZ-LISVLLVLLME	Hélice
	332-345	JLZ-EKSILKLYEEAMK	Hélice
	316-327	JLZ-KSYLRELRKRVEA	Hélice

CONCLUSIONES

Con los péptidos diseñados imitando fragmentos estructurados de las proteínas LipL32 y LipL41, de acuerdo a resultados experimentales obtenidos para la proteína HPV16E7 de cáncer

de cuello uterino (Calvo y otros, 2003), podemos esperar que al sintetizar los péptidos correspondientes, las secuencias que resulten altamente inmunogénicas en ensayos de ELISA, mostrarán una alta reactividad con sueros de pacientes expuestos a la leptospirosis y podrán ser seleccionados como candidatos para marcadores en métodos de diagnóstico para leptospirosis.

Bibliografía:

1. Alonso, C; García F.J; Ortega, L. (2001). Epidemiología, diagnóstico y control de la Leptospirosis Bovina (Revisión). Prod. Sanid. Anim. Vol. 16 (2), Madrid, España. 206-221
2. Anfinsen, C.B. (1973) Pinciples that govern the folding of protein chain. *Science 181,* 223-229
3. Barnet, J.; et ál. "Expression and Distribution of Leptospiral Outer Membrane Components during Renal Infection of Hamsters". Infect. Immun. 67. 2. (1999):853–861.
4. Bello, S; Rodríguez, M; Paredes, A; Mendivelso, F; Walteros, D; Rodríguez, F; Realpe, M. (2013) Comportamiento de la vigilancia epidemiológica de Leptospirosis humana en Colombia 2007-2011. *Revista Biomédica 2013;33(Supl.1):153-60*
5. Calderón, R. (2007) Inmunoquímica. *Universidad NAcional Autónoma de México.* instituto de Biotecnología.
6. Calvo, J. C., & Satterthwait, A. (2005). Imitando epítopes en proteínas: uso de ligandos hidrazona para la restricción conformacional. 27-40.
7. Calvo, J., Choconta, K., Diaz, D., Orozco, O., Bravo, M., Espejo, F., y otros. (2003). An Alpha Helix Conformationally Restricted Peptide Is Recognized by Cervical Carcinoma Patients' Sera. *Journal of Medicinal Chemistry* , 5389-5394.
8. Carrada, T (2005) Leptospirosis humana: historia natural, diagnóstico y tratamiento. *Revista mexicana de patología clínica.* 246-255

9. Carrizo, A; Brihuega, B; Etchechoury, I; Arese, A; Romero, S; Gioffre, A; Romano, I; Caimi, K. (2009). Identificación de antígenos inmunorreactivos de *Leptospira interrogans. Revista Argentina de Microbiología 41:* 129-133.
10. CDC public Health Image Library Image credit: CDC/NCID/HIP/Janice Carr (PHIL #1220)
11. Coto, C. (s.f) Curso de introducción al conocimiento científico experimental.
12. Flannery, B; et ál. "Evaluation of recombinant Leptospira antigen based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis". J. Clin. Microbiol. 39. 9. (2001): 3303–3310.
13. Galván, A; Y Túnez, I (s,f) Inmunoanálisis. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.* Universidad de Córdoba
14. García, R., Reyes, A., Basilio, D., Ramírez, M., & Rivas, B. (2013). Leptospirosis; un problema de salud pública. *Revista Latinoamericana de patología clínica* , 57-70.
15. Gasque, R (2008) Enciclopedia Bovina. Universidad Autónoma de México, Facultad de Veterinaria y Zootecnia, 168-172
16. González, A., Rodríguez, Y., Batista, N., Valdés, Y., & González, M. (2003). Caracterización microbiológica de cepas candidatas vacunales de Leptospira interrogans serogrupo Ballum. *Revista Cubana de Medicina Tropical* , 146-152.
17. Guzmán, E. (2004) La pruebas de ELISA. *Gac Méd Méx Vol. 140, Suplemento No. 3*
18. Haake, D; et ál. "Changes in the Surface of Leptospira interrogans Serovar grippotyphosa during In Vitro Cultivation". Infect. Immun. 59. 3. (1991): 1131–1140.

19. Haake, D; et ál. “Molecular Evolution and Mosaicism of Leptospiral Outer Membrane Proteins Involves Horizontal DNA Transfer”. J. Bacteriol. 186. 9. (2004): 2818–2828.
20. Haake, D; et ál. “The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection”. Infect. Immun. 68.4. (2000): 2276–2285.
21. Hofle,U; Blanco, J. (s,f) La serología como instrumento diagnóstico en Fauna Salvaje: El cuando, que y como de las pruebas diagnósticas de agentes etiológicos. *Aquila Foundation y Centro de Estudios de Rapaces Ibéricas.* La Mancha
22. Imagen recuperada de: http://phil.cdc.gov/phil/home.asp
23. Imagen Recuperado de: http://www.bioacademia.com.mx/miembros/tecnologia
24. Imagen recuperado de: www.lifetechnologies.com/co/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html
25. Instituto Nacional de Salud (2014) Protocolo de Vigilancia en Salud Pública, Leptospirosis. versión 01
26. Instituto Nacional de Salud. (2015). Boletín Epidemiológico Semanal (BES) Semana epidemiológica número 14 de 2015, *Instituto Nacional de Salud.* Colombia.
27. Instituto Nacional de seguridad e higiene en el trabajo (2013) *DataBio.*
28. Ko, A; Goarant, C; Picardeau, M. (2009) *Nat Rev Microbiol. ; 7(10): 736–747. doi:10.1038/nrmicro2208*
29. Laguna, V. (2000) Leptospirosis. Oficina General de Epidemiología. Lima Perú

30. Macías, J; Vergara, C; Romero, C; Falconar, A. (2004). Comportamiento de la Leptospirosis en el departamento del Atlántico (Colombia) Enero de 1999 a Marzo de 2004. 18-27
31. Martínez, G. R. (2000). Estado actual de la Leptospirosis. *Revista Unicórdoba* , 61-63.
32. Ministerio de Salud (2014) Enfermedades infecciosas, Leptospirosis, Diagnóstico de la Leptospirosis. Guía para el equipo de salud. República de Argentina.
33. Ministerio de Salud pública (s,f) Guía de control y manejo de Leptospirosis.
34. Murphy, T. y Bartos L. "Human bactericidal antibody response to outer membrane protein P2 of nontypeable Haemophilus influenzae". Infect. Immun., 56. 10. (1988): 2673–2679.
35. Obregón, A. (2009) Sistemas serológicos rápidos y su impacto en el diagnóstico de Leptospirosis humana en Cuba. *Instituto de Medicina tropical "Pedro Kouri"*. La Habana
36. Ochoa, F (2012) Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. Finaly Ediciones. La Habana
37. Ochoa, J; Sanchéz, A; Ruiz, I. (2000). Epidemiología de la Leptopirosis en una zona Andina de producción pecuaria. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.* Colombia. 325-330
38. Organización Mundial de la Salud (1981) Tecnicas rápidas de laboratorio para el diagnóstico de infecciones víricas, Ginebra.
39. Organización Mundial de la Salud (2010) Report of the first meeting of the leptospirosis burden epidemiology reference group. Geneva

40. Organización Mundial de la Salud. (2008). *Leptospirosis Humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control.* Rio de Janeiro.

41. Organización Mundial de la Sanidad Animal (2008) Manual de la OIE sobre animales terrestres Capítulo 2.1.9. — Leptospirosis.

42. Pulido, A; Carreño, G; Mercado, M, Ramirez, P (2014) Situación epidemiológica de la leptospirosis humana en Centroamérica, Suramérica y el Caribe. *Univ. Sci. 2014, Vol. 19 (3): 247-264*

43. Ramírez, B; De la Viña, S; San Andrés, M. (s,f). Fundamentos de las técnicas inmunoquímicas y sus posibles aplicaciones en la caracterización de aglutinantes proteícos. *Universidad complutense de Madrid.* 48-52.

44. Rodriguez, G. (2000). Estado actual de la Leptospirosis. *MVZ-CORDOBA 2000; 5:(1)*, 61-63

45. Saad,C; Moron,L: Parra, E; Higuera,L; PAcheco, A. (2006) Leptospirosis humana: hallazgos clínicos e histopatológicos en un caso y revisión de la literatura. *Revista Colombiana de Enfermería volumen 1.* 51-61

46. Sakolvaree, Y., Maneewatch, S., Jiemsup, S., Klaysing, B., Tongtawe, P., Srimanote, P., y otros. (2007). Proteome and Immunome of Pathogenic Leptospira spp. Revealed by 2DE and 2DE-Immunoblotting with Immune serum. *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY* , 53-73.

47. Secretaría de Salud (2012) Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la Leptospirosis. *Dirección General de Epidemiología.* México D.F. 16- 37.

48. Shang, E.; Summers, T. y Haake, D. “Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic Leptospira species”. Infect. Immun. 64. 6. (1996): 2322–2330.

49. Speciale, J. (s,f) Leptospirosis. Provincia del Chaco *Dirección de salud educativa*

50. Su, H; Mayorga, A. (2009) Meningitis por Leptospira: reporte de un caso y revisión de literatura. *Rev Med Hondur 2009;77(2):72-74*

51. Zavala, J; Vado, I; Rodríguez, M; Rodríguez, E; Barrera, M; Guzmán, E. (1998) Leptospirosis anictérica en un brote epidémico de dengue en la Península de Yucatán. *Revista biomédica 9:78-83.*

52. Zhang, Y (2008) I-TASSER server for protein 3D bioinformatics, 9:40

53. Zuerner, R; Knudtson,W.; Bolin, C. y Trueba, G. “Characterization of outer membrane and secreted proteins of Leptospira interrogans serovar Pomona”. Microbiol. Pathog., 10. 4. (1991):311–322.

54. Zunino, E., & Pizarro, R. (2007). Leptospirosis Puesta al día. *Revista chilena de infectología* , 220-226.

APÉNDICE 1

DISEÑO DE PEPTIDOS CON RESTRICCIÓN CONFORMACIONAL DE PROTEINAS DE SUPERFICIE DE *Leptospira interrogans*

DESIGN OF CONFORMATIONAL RESTRAINT PEPTIDES FROM SURFACE *Leptospira interrogans* PROTEINS

Julio C. Calvo[1], Ana M. García[1], Aleidy Galindo[2].

(1) Grupo Proteoma UD, Facultad de Ciencias y Educación, Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Carrera 4 No.26-D-54, Bogotá, Colombia. Correos: jccalvom@udistrital.edu.co, anamgarciac@correo.udistrital.edu.co.

(2) Grupo FORTIUS, Facultad de Educación Física militar , Escuela Militar de Cadetes General José María Córdova. Calle 80 No 38 -00. Bogotá, Colombia. Correo: aleidyga@hotmail.com

RESUMEN

La Leptospirosis es una enfermedad causada por bacterias del género Leptospira que afectan en su mayoría a animales, pero puede infectar a seres humanos a través del contacto con la orina del animal hospedero o con fuentes de agua contaminadas. Las técnicas de diagnóstico actuales son lentas y poco confiables. En este trabajo se analizaron computacionalmente las proteínas LipL32 y LipL41 de la bacteria *Leptospira interrogans* y se diseñaron siete péptidos que imitan fragmentos expuestos estructurados de estas proteínas. Se espera que el uso de estos péptidos en ensayos de ELISA permitan identificar marcadores para mejores métodos de diagnóstico en esta enfermedad.

Palabras clave: Leptospirosis, péptidos con restricción conformacional, proteína LipL32, proteína LipL41, proteínas de superficie de leptospira, estructura terciaria de LipL41.

ABSTRACT

Leptospirosis is a disease caused by bacteria of the genus Leptospira that affects mostly animals but can infect humans through contact with the urine of host animal or contaminated water sources. Current diagnostic techniques are slow and unreliable. This paper analyzed computationally LipL32 and LipL41 proteins of bacteria *Leptospira interrogans* and seven peptides that mimic exposed structured fragments of these proteins were designed. It is expected that the use of these peptides in ELISA assays lead to identify markers for improved diagnosis methods of this disease.

Keywords: Leptospirosis, conformational restraint peptides, protein LipL32 protein LipL41, leptospira surface proteins, LipL41 tertiary structure.

RESUMO

A leptospirose é uma doença causada por bactérias do gênero Leptospira, que afeta principalmente animais, mas pode infectar os seres humanos através do contato com a urina do animal hospedeiro ou fontes de água contaminada. Técnicas de diagnóstico atuais são lentos e pouco confiáveis. Este artigo analisou computacionalmente LipL32 e LipL41 proteína bactérias *Leptospira interrogans* e sete peptídeos que imitam expostos fragmentos estruturados destas proteínas foram projetados. Espera-se que a utilização destes péptidos em ensaios ELISA para identificar marcadores para os métodos de diagnóstico melhorados para esta doença.

Palavras-chave: Leptospirose, péptidos de restrição de conformação, LipL41 proteína LipL32 proteína, proteínas de superfície leptospira, LipL41 estrutura terciária.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad endémica en zonas rurales de países tropicales y es causada por una espiroqueta perteneciente al género Leptospira. Estas bacterias presentan en su superficie las lipoproteínas LipL32 y LipL41 y las porinas OmpL1 y Omp85, las cuales son inmunogénicas y desencadenan la respuesta del organismo infectado (García y otros, 2013). En el género Leptospira encontramos especies patógenas, entre las cuales podemos mencionar *L. borgpetersenii, L. inidai,* ***L. interrogans****, L. Kirschneri, L.noguchii, L. santarosai y L. weilii* (Martínez, 2000), siendo *Leptospira interrogans* el grupo más numeroso. Cuando el hospedero tiene contacto con la orina de un animal portador, la bacteria penetra por el tejido mucoso o por heridas en la piel y luego se aloja en diferentes órganos, en los cuales produce daños; sin embargo, en los riñones se aloja en los túbulos renales, para luego ser excretada al medio y empezar nuevamente su ciclo de vida (García y otros, 2013).

En la leptopirosis, la respuesta inmune del hospedero generalmente ocurre a las dos semanas de la exposición, pero estudios han demostrado que la enfermedad se puede desencadenar pasados 4 días, produciendo una enfermedad bifásica en la que se caracteriza una etapa inicial que es de infección y una etapa posterior que se denomina "inmune". En esta última etapa, la bacteria desaparece del torrente sanguíneo al ser fagocitada por linfocitos, seguida por un proceso inflamatorio del sistema nervioso central, debido a la reacción cruzada de los anticuerpos en contra de tejidos del hospedero (García y otros, 2013). La sintomatología suele ser similar a la de una gripe y es por ello que en la mayoría de los casos se diagnostica de forma erronea; en otros casos se confunde con meningitis, hepatitis, dengue o fiebres virales hemorrágicas, con base en los cuadros clínicos que presenta el paciente. El daño en la capa endotelial de pequeños vasos sanguineos, provoca fallas generalizadas en los órganos afectados y manifestaciones tales como hemorragias por reduccion en el número de plaquetas, dolores fuertes y necrosis hepatocelular, que se suelen superponer a medida que avanza la infección (Organización Mundial de la Salud, 2008).

En Colombia, entre 2013 y 2014, hubo un incremento del 13.94% de casos de leptospirosis reportados como positivos, en regiones tales como Cartagena, Quindío, Valle del Cauca y Tolima. Sin embargo, el 89.23% de los casos en otras regiones del país, sólo se notifican como sospechosos y solo un 10.76% ha sido confirmado por análisis de laboratorio (Instituto Nacional de Salud, 2014). Entre los métodos más usados para el diagnóstico de leptospirosis están las pruebas de aglutinación microscópica (MAT) y el ensayo de ELISA con inmersión de antígenos específicos en el suero del paciente marcados con enzimas fluorescentes. Desafortunadamente, las pruebas de aglutinación son costosas, poco accesibles y requiere de cultivos de diferentes tipos de leptospiras para observar cuál reacciona con el suero del paciente, y el diagnóstico sería tardío (Organización Mundial de la Salud, 2008). Por otro lado, el ensayo de ELISA con inmersión de antígenos, aunque de gran sensibilidad y rapidez, suele generar falsos positivos al reconocer anticuerpos de otras enfermedades, lo que la hace poco confiable (García y otros, 2012).

Los péptidos sintéticos han encontrado importantes usos como drogas, para generar anticuerpos hacia sitios específicos de las proteínas, en métodos de diagnóstico y como posibles candidatos a vacunas; sin embargo, los péptidos en gran medida son desordenados en agua y no imitan bien los fragmentos estructurados de la proteína de donde provienen y por lo tanto no tienen buena afinidad con los anticuerpos generados por proteínas de virus/ bacterias o, inversamente, no pueden generar anticuerpos que tengan alta afinidad con las proteínas de donde provienen los péptidos. Con el fin de mejorar la actividad, los péptidos deben ser restringidos conformacionalmente para que imiten la estructura tridimensional del fragmento de donde provienen (Calvo y otros, 2003; Calvo y Satterthwait, 2005).

En este trabajo, se calculó la estructura tridimensional de proteínas de superficie de leptospira, su accesibilidad a solventes y se seleccionaron fragmentos para diseñar péptidos que imitaran su estructura. Los diseños propuestos se espera que puedan ser sintetizados y probados en ensayos de ELISA para detectar leptospirosis en pacientes con una alta sensibilidad y sin falsos positivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Antígenos de superficie de *leptospira interrogans*

Para conocer la secuencia y la estructura de las proteínas de superficie, se lleva a cabo una búsqueda en la base universal de datos de proteínas PDB (Protein Data Bank). En esta base aparecen las publicaciones de expresión, cristalización de fragmentos y la estrategia para hallar la estructura, ya sea por resonancia magnética nuclear (RMN) o por cristalografía de rayos X.

Calculo de estructura de los antígenos.

Una vez obtenidas las secuencias en el PDB, se aplican en el programa I-TASSER, que es un servidor para el cálculo y predicción de estructuras secundaria y terciaria de proteínas. (Zhang, 2008)La duración del análisis realizado por el programa demora entre 1 y 3 días por proteína aproximadamente.

Análisis de la estructura

Las imágenes en 3D de las estructuras obtenidas en el servidor I-TASSER y las encontradas en el PDB se comparan buscando similitudes de los fragmentos expuestos con el fin de encontrar secciones más exactas. En este caso se usa el programa J-mol para el manejo de las estructuras reportadas en PDB y para las calculadas por I-TASSER existe una herramienta interna del mismo programa.

Selección de los fragmentos

Una vez obtenida la estructura terciaria, se analizan las subestructuras externas para seleccionar pequeños fragmentos de la proteína teniendo en cuenta la accesibilidad y definición de las estructuras que la conforman (hélices, hojas beta y loops).

Diseño de los fragmentos con restricción conformacional

Siguiendo la estrategia de Satterthwait (Calvo y Satterthwait, 2005). Para la síntesis de péptidos que imiten alfa-hélices, al final de la secuencia seleccionada se introduce el sitio de nucleación JLZ-, y para imitar loops la secuencia se introduce entre los ligandos J y Z (figura 1).

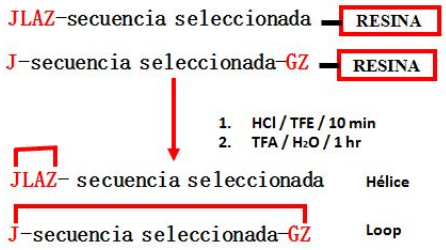


Figura 1. Estrategia de síntesis de péptidos con restricción conformacional.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El patógeno causante de leptospirosis presenta un gran número de proteínas, sin embargo existen dos lipoproteínas altamente inmunogénicas que fueron seleccionadas para el estudio: LipL32 y LipL41

Secuencia de los antígenos

En la base de datos PDB se encontraron las siguientes secuencias de aminoácidos para cada una de las proteínas:

Proteína LipL32:
MKKLSILAISVALFASITACGAFGGLPSLKSSFVLSEDTIPGTNETVKTLLPYGSVINYGYV
KPGQAPDGLVDGNKKAYYLYVWIPAVIAEMGVRMISPTGEIGEPGDGDLVSDAFKAAT
PEEKSMPHWFDTWIRVERMSAIMPDQIAKAAKAKPVQKLDDDDDGDDTYKEERHNKY
NSLTRIKIPNPPKSFDDLKNIDTKKLLVRGLYRISFTTYKPGEVKGSFVASVGLLFPPGIPG
VSPLIHSNPEELQKQAIAAEESLKKAASDATK

Proteína LipL41:
MRKLSSLISVLVLLMFLGNCAATVDVEYPVFPKDKEGRALQKFLGTIRNVGLAVEAPKK

SLWEAIFGEGSSFIDQMPSKVFEAFDKESYYKLTDLSKRADAINEASLSLTGITKNRAKIG
NLIGAEAILYIGYQKPYTECSTENKIDAVAAGLKVAGFAASMATGKDVNTGNEPVSKPT
GVRMMLIPLDATLIKVETGEVKKAVVSSPAKIFNSVGNLECPSILDSFGQGLDEAAAYIK
GRLSPIVKTERIKVFVKDEDEEVKELLQEGYEEIVGETPSFKKAKEAWEKADKKAKGQS
WGAKANLATYYFSTGDFEKSIKLYEEAMKLKDADKSYLRELRKRVEATFAVDESNAK

Cálculo de estructura terciaria de la proteína LipL32 por I-TASSER

El programa realizó una serie de cálculos e interacciones en redes neurales con datos de otras proteínas y halló 5 posibles estructuras de la proteína (Figura 2) cada estructura tiene dos valores: el C-Score y el TM-Score. El primero determina la calidad de la predicción y se mide en un rango de -5 a 2, en donde un valor alto indica que la predicción es más cercana a la estructura nativa. El TM-Score es una medida de la semejanza estructural entre dos estructuras usadas como referencia para medir el modelo con respecto a una estructura nativa conocida (Zhang, 2008).



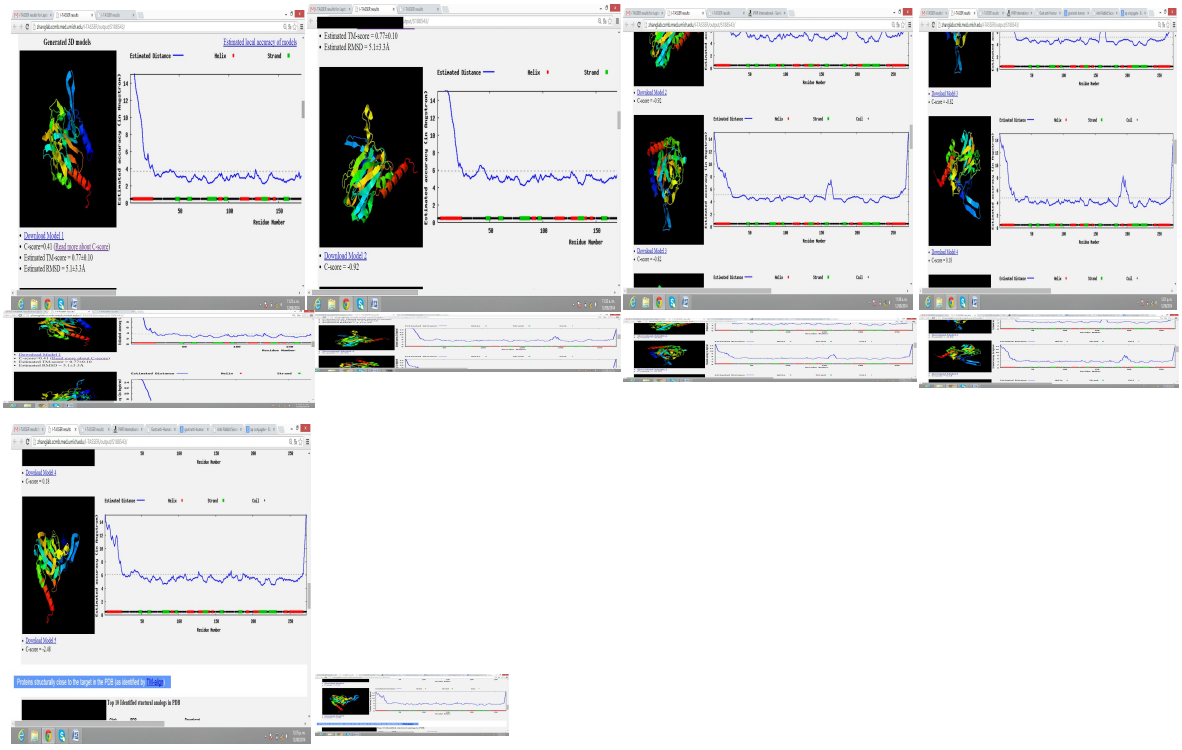


Figura 2. Modelos obtenidos en el cálculo de estructura terciaria de la lipoproteína LipL32 en el servidor I-TASSER

Para la selección del modelo con un mayor valor de confianza en la predicción, se tomó como base el C-Score, en donde el mayor valor es 0.40 y corresponde al modelo 1.

Cálculo de estructura terciaria de la proteína LipL41 por I-TASSER

Para esta proteína se procedió de la misma manera con el servidor I-Tasser; los cinco modelos que resultaron del cálculo presentaron los siguientes valores C-Score: modelo 1=0.70, modelo 2= -1.9, Modelo 3=-0.2, Modelo 4= -2.3, Modelo 5= 0.24. Con base en estos datos, se escogió el modelo 1 (figura 3).



Figura 3. Modelo 1 obtenido en el cálculo de estructura terciaria de la lipoproteína LipL41 en el servidor I-TASSER.

Análisis de las estructuras

Al analizar la predicción obtenida por I-TASSER con la obtenida por estudios con difracción de rayos X en cristales de la proteína LipL32, se pudo corroborar que hay una gran similitud entre ambas y, por lo tanto, había un margen de confianza para estudiar la lipoproteína LipL41, aplicando solo la predicción, dado que no existe un estudio cristalográfico de la misma.

Para el análisis de la estructura y la selección de los fragmentos se tuvo en cuenta los siguientes factores:

1. La accesibilidad de los fragmentos, es decir, que estén en la parte externa de la proteína y sean reconocidos fácilmente por el sistema inmune.
2. Que correspondan a subestructuras definidas, tales como hélices y Loops.

Selección de los fragmentos

Proteína LipL32

El servidor I-TASSER además de mostrar la predicción de la estructura terciaria de la proteína, también arroja la predicción para la estructura secundaria que es muy útil a la hora de seleccionar los fragmentos ya que muestra la posición de los aminoácidos dentro de la proteína. (Figura 4) La accesibilidad de los fragmentos se califica en un rango de 0 a 9 en donde a mayor valor numérico, mayor la accesibilidad del fragmento.

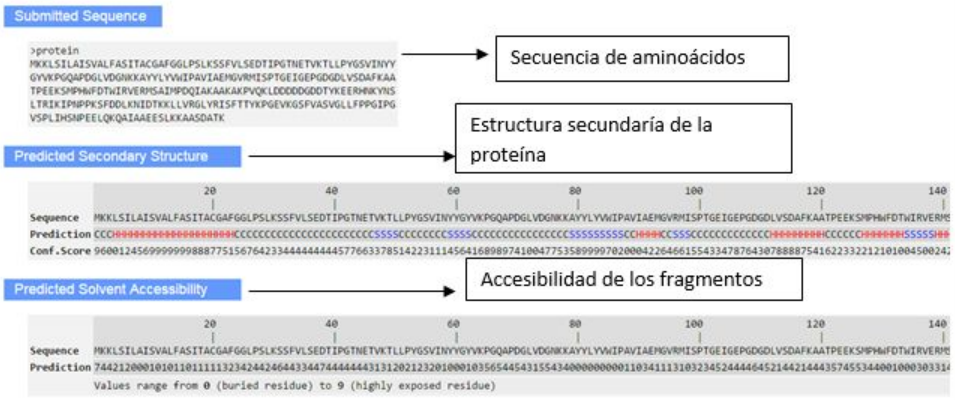


Figura 4. Modelo de estructura secundaria y accesibilidad calculada por I-TASSER

En base a esto se seleccionaron 4 subestructuras en la lipoproteína LipL32: 3 α-hélice comprendidas entre los aminoácidos Ser-5 e Ile-17 (SILAISVALFASI), Glu-250 y Glu-261 (ELQKQAIAAEE), Ala-258 y Ala-267 (AAEESLKKAA) y una loop entre Thr-39 y Thr-46 (TIPGTNET) (Figura 5).

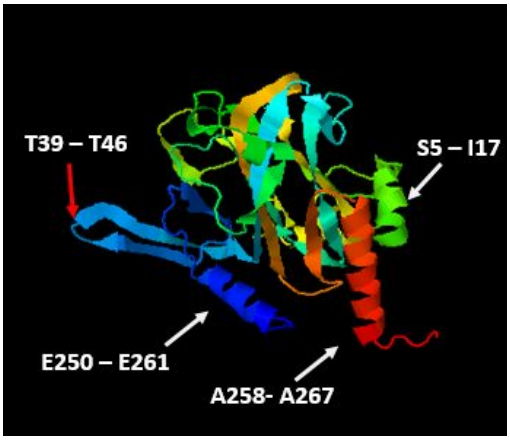


Figura 5. Secuencias seleccionadas a partir del análisis estructural de la proteína LipL32

Proteína LipL41

Siguiendo el mismo procedimiento se seleccionaron 3 secuencias para la lipoproteína LipL41, todas con una estructura de α-hélice. Las secuencias se muestran a continuación en la (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias seleccionadas a partir del análisis estructural de la proteína LipL41

PROTEÍNA	POSICION	SECUENCIA
LipL41	7-16	LISVLLVLLME
	332-345	EKSILKLYEEAMK
	316-327	KSYLRELRKRVEA

Diseño de los péptidos con restricción conformacional

La actividad y función de las macromoléculas biológicas es fuertemente dependiente de su estructura y de las interacciones con su medio ambiente (Anfinsen, 1973). sin embargo, no siempre se cuenta con los datos de resonancia magnética nuclear o de cristalografía de rayos X para la estructura de una proteína en particular, pero, afortunadamente, se cuenta con una gran cantidad de algoritmos, diseñados para predecir la estructura de una proteína. Con este fin, para el diseño de los péptidos se empleó la estrategia de Satterthwait (Calvo y Satterthwait, 2005), cuyos resultados ya han sido probados en otras enfermedades (Calvo y otros, 2003). En la tabla 2 se muestran los diseños basados en estas premisas, en donde para los péptidos con restricción conformacional a alfa-hélice el sitio de nucleación JLZ- se introduce después de la secuencia seleccionada y para el caso de las loops la secuencia se introduce entre los ligandos J y Z como se muestra.

Tabla 2. Péptidos diseñados

PROTEÍNA	POSICION	SECUENCIA	CONFORMACIÓN
LipL32	5-17	JLZ-SILAISVALFASI	Hélice
	250-261	JLZ-ELQKQAIAAEE	Hélice
	258-267	JLZ- AAEESLKKAA	Hélice
	39-46	J- TIPGTNET-Z	Loop
LipL41	7-16	JLZ-LISVLLVLLME	Hélice
	332-345	JLZ-EKSILKLYEEAMK	Hélice
	316-327	JLZ-KSYLRELRKRVEA	Hélice

Con los péptidos diseñados imitando fragmentos estructurados de las proteínas LipL32 y LipL41, de acuerdo a resultados experimentales obtenidos para la proteína HPV16E7 de cáncer de cuello uterino (Calvo y otros, 2003), podemos esperar que al sintetizar los péptidos correspondientes, las secuencias que resulten altamente inmunogénicas en ensayos de ELISA, mostrarán una alta reactividad con sueros de pacientes expuestos a la leptospirosis y podrán ser seleccionados como candidatos para marcadores en métodos de diagnóstico para leptospirosis.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por la Escuela Militar de Cadetes General José María Córdova y la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, en el proyecto "Análisis preliminar de proteínas superficiales de *Leptospira interrogans* como un nuevo método de diagnóstico" aprobado en la convocatoria "Financiamiento para investigación científica" de mayo de 2013.

Bibliografía:

1. Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chain. *Science* 181, 223-229.

2. Calvo, J., Choconta, K., Diaz, D., Orozco, O., Bravo, M., Espejo, F., y otros. (2003). An Alpha Helix Conformationally Restricted Peptide Is Recognized by Cervical Carcinoma Patients' Sera. Journal of Medicinal Chemistry , 5389-5394.

3. Calvo, J. C., & Satterthwait, A. (2005). Imitando epítopes en proteínas: uso de ligandos hidrazona para la restricción conformacional. 27-40.

4. García, R., Feraud, D., Lugo, S., Abeledo, M., & Machado, H. (2012). Evaluación de un ELISA indirecto utilizando antígeno de leptospira biflexa en caninos con sospecha clínica de leptospirosis. Revista Electrónica de Veterinaria, 5-6.

5. García, R., Reyes, A., Basilio, D., Ramírez, M., & Rivas, B. (2013). Leptospirosis: un problema de salud pública. Revista Latinoamericana de patología clínica , 57-70.

6. Instituto Nacional de Salud. (2014). Boletín Epidemiológico Semanal (BES).

7. Organización Mundial de la Salud. (2008). Leptospirosis Humana: Guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Rio de Janeiro.

8. Zhang, Y (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics, 9:40