



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

CARACTERIZACIÓN DE UNA PROTEÍNA DE
60kDa DE *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjo.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS

P R E S E N T A

JORGE ALEJANDRO RODRÍGUEZ JIMÉNEZ

TUTOR: DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA

COMITÉ TUTORAL: DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ

DR. VÍCTOR MANUEL BANDA RUÍZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres Magdalena y Jesús, por todo el apoyo y cariño que he recibido, además de sus enseñanzas que me han ayudado en la vida.

A todas esas personas que de alguna u otra forma han formado parte de mi vida y que gracias a ellos he podido desarrollarme tanto en lo personal como en lo profesional.

Alex.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México – Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Agradecimiento especial al Dr. Alejandro De la Peña por todo su apoyo, así como por su amistad y enseñanzas.

Al Dr. Víctor M. Banda por su apoyo brindado para llevar a cabo este proyecto y por sus valiosos comentarios y al Dr. Antonio Verdugo por sus comentarios y puntos de vista, así como las facilidades para ocupar equipo en su laboratorio.

Al Prof. David A. Haake de la Universidad de California (UCLA) por su apoyo con el protocolo de extracción de proteínas de membrana externa.

A los doctores miembros del jurado Jorge I. Torres Barranca y Edmundo Calva Mercado por sus comentarios sobre el proyecto.

A la Dra. Yolanda López Vidal por su apoyo para poder realizar geles de doble dimensión en su laboratorio en la Facultad de Medicina, así como a Mauricio Rodríguez por su ayuda en la elaboración de los geles y por todos sus comentarios.

A Ernesto Armando Rodríguez por todo su apoyo durante mi estancia en el laboratorio y por su valiosa amistad.

A mis compañeros de laboratorio Rodrigo, Carlos, José Manuel, Olivia, Raquel, Tania, Erika M, Erika O, Diana, Elena y Pablo.

A toda la gente del Departamento de Microbiología e Inmunología por sus comentarios y apoyo.

Este proyecto se realizó en el laboratorio del Grupo de Investigación en *Leptospira* y leptospirosis del Departamento de Microbiología e Inmunología UNAM-FMVZ. Proyecto financiado por PAPIIT (IN 205202) Y UC-MEXUS-CONACYT (CN-02-54). Responsable del proyecto y tutor principal Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Leptospirosis	3
Epidemiología	4
Presentación clínica de la leptospirosis	5
Patogénesis	8
Diagnóstico	10
Cultivo	12
Serología	13
Métodos moleculares	13
Tratamiento	14
Inmunidad	14
Microbiología de <i>Leptospira</i>	16
Taxonomía y clasificación	19
Lipopolisacárido o endotoxina	20
Proteínas de membrana externa	22
ANTECEDENTES	29
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	30
MATERIAL Y MÉTODOS	31
Cultivo bacteriano	31
Extracción de PME con Tritón X-114	31
Cuantificación de proteína	32
Separación electroforética de las PME en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS	34
Inmunodetección tipo Western	35
Electroelusión	36
Cuantificación de proteína por el método de Bradford	37
Separación de las PME en 2 dimensiones	38
Preparación de la muestra	44
Rehidratación de tira de Gradientes de pH inmovilizados (GPI)	44
Enfoque isoelectrico (EIE)	45
Equilibrio de la tira GPI	47
Gel de poliacrilamida-SDS	47
Visualización	48
RESULTADOS	49
Cultivo bacteriano	49
Cuantificación de proteínas de membrana externa	49
Separación electroforética de las PME en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS	51
Inmunodetección tipo Western	51
Separación de las PME en 2 dimensiones	65
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES	72
LITERATURA CITADA	73
APÉNDICE DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES	84

RESUMEN

La leptospirosis se considera una de las enfermedades zoonóticas más difundidas en el mundo. La enfermedad se transmite por agua contaminada, exposición directa a la orina o tejidos de animales infectados. Es causada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira*. Este género se encuentra comprendido por 3 especies no patógenas y 9 especies patógenas organizadas dentro de 23 serogrupos y alrededor de 250 serovariedades. Dentro de los antígenos de interés se encuentran los localizados en la membrana externa (ME). Una proteína de 60 kDa fue reconocida en diferentes serovariedades de *L. interrogans* por sueros de bovinos positivos a leptospirosis y da inicio al presente trabajo. El objetivo de este proyecto fue determinar si dicha proteína de *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjo está localizada sobre la membrana externa. A partir de cultivos de *L. interrogans* serovariedad Hardjo (Hardjoprajtino) se realizó la extracción de proteínas de ME de acuerdo a la metodología descrita por Haake *et al.* (1991). Las proteínas fueron separadas en geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) y a partir de éstos se hizo la transferencia de la proteína a membranas de nitrocelulosa para llevar a cabo la inmunodetección tipo Western utilizando sueros de bovino con títulos de anticuerpos de 1:800. Posteriormente, se hicieron ensayos en doble dimensión para verificar si se trataba de una sola proteína con el peso de 60 kDa o de varias proteínas con el mismo peso. Extractos de membranas externas de *L. interrogans* serovariedad Hardjo mostraron proteínas de 60 kDa. Geles de doble dimensión mostraron proteínas de 60 kDa con un punto isoeléctrico de alrededor de 5, las cuales eran diferentes a GroEL.

ABSTRACT

The Leptospirosis is considered a zoonosis diffused in around the world. The disease might be transmitted by contaminated water or direct exposure to urine of infected animals. It is caused by spirochetes of the genus *Leptospira*. This genus includes 3 nonpathogenic species and 9 pathogenic species that include 23 serogroups and more than 250 serovars. Among the antigens of interest are those located in the outer membrane (OM). A protein of 60 kDa was present different serovars of *L. interrogans*. The objective of this work was to determine whether this protein of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo was located on the outer membrane. Extraction of OM proteins was carried out from *L. interrogans* serovar Hardjo (Hardjoprajitno) cultures according to the methodology described by Haake et al. (1991). The proteins were separated in gels denaturing (SDS-PAGE) and transfer of proteins was made to nitrocellulose membranes to carry out a Western blot assay using bovine sera with antibody titers of 1:800. Later, double dimension to verify if whether this was a single protein with the weight of 60 kDa. OM extracts of *L. interrogans* serovar Hardjo showed a 60kDa immunogenic protein. Double dimension polyacrylamide gels showed proteins of 60 kDa with an isoelectric point about 5 different from GroEL.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución global (Barthi, *et al.* 2003), con serovariedades predominantes por región y especie animal afectada, es considerada una importante enfermedad endémica en diversas partes del mundo (Barocchi *et al.*, 2001; Levett, 2001) común en áreas tropicales y subtropicales como el Caribe o el sureste de Asia (Brown *et al.*, 2003; Gamberini *et al.*, 2005), pero también se han documentado brotes en países templados como los Estados Unidos (Nally *et al.*, 2003). Afecta al hombre y a los mamíferos y es causada por espiroquetas del género *Leptospira* (Banda *et al.*, 1996; Rossetti *et al.*, 1999; Smits *et al.*, 2000; Flannery *et al.*, 2001; Cullen *et al.*, 2003). La enfermedad se transmite a través de agua contaminada o exposición directa a la orina o tejidos de animales infectados (Arzouni *et al.*, 2002; Yiu *et al.*, 2003; Hsieh *et al.*, 2004).

La amplia distribución de las especies de *Leptospira* refleja su habilidad para sobrevivir en diversas condiciones medio ambientales (Haake *et al.*, 2000). El hábitat natural de las serovariedades patógenas son los túbulos renales en una amplia variedad de huéspedes mamíferos, lo que hace que la leptospirosis sea una de las zoonosis más diseminadas en el mundo (Barochi *et al.*, 2001; Haake *et al.*, 2005); es también una importante causa de abortos, mortinatos, infertilidad, disminución en la producción de leche y muertes en el ganado (Haake *et al.*, 1991).

Leptospirosis

La leptospirosis es una zoonosis económicamente importante causada por espiroquetas del género *Leptospira* que se encuentra difundida ampliamente en el mundo (Haake *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2000). Representa uno de los grandes problemas de salud pública, particularmente en los trópicos, donde las tasas de incidencia anual tienen un estimado de hasta 3,000 por

cada 100,000 personas (Effler *et al.*, 2000). Es más frecuente en la población rural que en la urbana, las condiciones ambientales prevalentes en la mayoría de los países tropicales y subtropicales de América y el mundo (lluvias abundantes, desborde de aguas residuales durante las inundaciones, suelos no ácidos, altas temperaturas) favorecen la persistencia del agente causal y su transmisión (Effler *et al.*, 2000).

Epidemiología

Diversas serovariedades patógenas de *Leptospira* se encuentran distribuidas en la naturaleza (Zaragoza *et al.*, 2003), infectan a numerosas especies animales, silvestres y domésticas cuya orina es la principal fuente de infección para el hombre y otros animales susceptibles. Los animales más comúnmente afectados son los perros, vacas, cerdos, caballos y ovejas. En ellos, la infección puede presentarse desde una forma subclínica hasta severa y es causa de pérdidas económicas importantes en el ganado bovino y porcino (Rossetti *et al.*, 1999). Trueba *et al.* (2002) observaron que las especies patógenas pueden sobrevivir en agua o el suelo por períodos de 15 a 74 días, pero muy poco se sabe acerca de su capacidad para desarrollarse en estos medios (Trueba *et al.*, 2002).

Las leptospiras pueden permanecer durante largos períodos en los túbulos renales, siendo excretados con la orina sin que necesariamente el animal muestre signos de enfermedad, las leptospiras viables contaminan entonces el agua del medio (Faine *et al.*, 2000; Levett, 2001).

La mayor fuente de infección para el hombre la constituye la exposición directa a orina de esos animales o el contacto con agua y lodos contaminados con tales orinas, ya sea a través de actividades ocupacionales o recreativas (baño, pesca, deportes acuáticos) que pueden provocar la aparición de un brote de leptospirosis (Rossetti *et al.*, 1999; Levett, 2001; Haake *et al.*, 2002).

Por lo general, el hombre es un huésped en el que la transmisión de persona a persona es sumamente rara (Rossetti *et al.*, 1999).

La leptospirosis es reconocida como una causa común de enfermedad febril en medios tropicales alrededor del mundo. Es de gran importancia en la salud pública el incremento que se ha dado por reportes recientes de brotes asociados con actividades recreativas y epidemias de leptospirosis asociadas con graves síndromes neumónicos hemorrágicos (Faine *et al.*, 2000; Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003). La leptospirosis se ha extendido a poblaciones urbanas a través de Latino América y el Caribe. Epidemias con altos índices de fatalidad se dan anualmente durante periodos estacionales de intensas lluvias en áreas urbanas pobres que carecen de infraestructura sanitaria básica (Flannery *et al.*, 2001).

La población con riesgo de enfermar comprende la que habita zonas endémicas de los países tropicales subdesarrollados; mientras que en los países desarrollados suele ser una enfermedad en personas que trabajan con animales o sus productos, o en medios contaminados especialmente por roedores como médicos veterinarios, ganaderos, carniceros, trabajadores de frigoríficos, agricultores, trabajadores de la red de saneamiento, limpiadores de alcantarillas e incluso militares (Shang *et al.*, 1995; Flannery *et al.*, 2001).

Presentación clínica de la Leptospirosis

La infección puede presentarse de forma asintomática o bien se manifiesta con diversos cuadros clínicos (Diament *et al.*, 2002). Los síntomas de las personas con leptospirosis pueden variar en la severidad, con presencia desde una aparente gripe, con fiebre y dolor de cabeza, hasta una hemorragia pulmonar letal o daño hepático y renal (Matsunaga *et al.*, 2002, Bajani *et al.*, 2003; Hasnain *et al.*, 2004).

Los signos clínicos en animales son de forma aguda severa (septicemia, hepatitis, nefritis, meningitis) y crónica (abortos, nacimientos prematuros, infertilidad y nefritis crónica) (Banda *et al.*, 1996). En el ganado se manifiesta principalmente con infertilidad y abortos. El curso de la enfermedad es más severo en los terneros que en los adultos pudiendo observarse ictericia e infertilidad (Rossetti *et al.*, 1999).

El reconocimiento clínico de leptospirosis es difícil porque *Leptospira* puede afectar órganos de sistemas diferentes, resultando en una variedad de presentaciones clínicas (Nunes *et al.*, 1985, Effler *et al.*, 2002). Por consiguiente, la leptospirosis es a menudo mal diagnosticada y se puede confundir con diversas enfermedades como influenza, malaria, meningitis aséptica, encefalitis, fiebre del dengue, hepatitis, o gastroenteritis (Effler *et al.*, 2002; Bajani *et al.*, 2003). El diagnóstico oportuno de leptospirosis es esencial porque el tratamiento temprano en la enfermedad asegura un resultado clínico favorable (Effler *et al.*, 2002).

La presentación clínica de la leptospirosis es bifásica, con una fase aguda o septicémica durante la primera semana, seguida por la fase crónica inmune, caracterizada por la producción de anticuerpos y excreción de leptospiras en orina. Las complicaciones de la leptospirosis están asociadas con la localización de leptospiras entre los tejidos durante la fase crónica inmune y lo que ocurre durante la segunda semana de la enfermedad (Levett, 2001).

La gran mayoría de las infecciones causadas por *Leptospira* son subclínicas, sin embargo existen casos de muy alta severidad en pacientes que probablemente no tuvieron atención médica. La mayoría de los casos reconocidos presentan fiebre de principio agudo. Otros síntomas incluyen escalofríos, dolor de cabeza, mialgia, dolor abdominal, lagrimeo y en ocasiones eritema. El diagnóstico diferencial incluye comúnmente infecciones vírales

como influenza en los trópicos dengue y fiebre amarilla, además de las causas bacterianas de fiebre de origen desconocido y tifoidea (Levett, 2001).

La leptospirosis icterica es una enfermedad mucho más severa en la que el curso clínico es a menudo de progresión más rápida. Los casos severos a menudo se presentan más tarde durante el transcurso de la enfermedad y esto contribuye a elevar la alta tasa de mortalidad. La ictericia que ocurre en la leptospirosis no está asociada con necrosis hepatocelular y la función del hígado eventualmente, regresa a la normalidad.

Algunos reportes muestran que los casos con disfunción pulmonar pueden ser la mayor manifestación de leptospirosis y los pacientes pueden presentar síntomas entre los que se tienen tos y disnea. La severidad de la enfermedad no está relacionada a la presencia de ictericia y se observa hemorragia intra alveolar en la mayoría de los pacientes, aún en la ausencia de síntomas pulmonares manifiestos. La hemorragia pulmonar puede ser bastante severa para causar la muerte (Levett, 2001).

En el caso del ganado bovino, la leptospirosis se presenta alrededor de todo el mundo y es más frecuente el resultado de infecciones con serovariedades como Hardjo subtipos Hardjobovis o Hardjoprajitno o Pomona, entre otras. El ganado es mayormente infectado con *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo, subtipo Hardjobovis. Los signos de leptospirosis en el ganado pueden pasar desde totalmente inaparente a aguda, con fiebre, ictericia y hemoglobinuria. Los rasgos clínicos no son específicos o patognomónicos para leptospirosis. La severidad de la enfermedad dependerá de factores como, edad, y la relativa inmunidad del animal, la serovariedad involucrada, así como la virulencia de tal serovariedad. Signos clínicos presentes incluyen, fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria, ictericia, congestión pulmonar y ocasionalmente meningitis y la muerte. Los animales que se recuperan pueden presentar pobre crecimiento y lesiones renales significativas (Faine *et al.*, 2000). En la forma crónica de leptospirosis bovina,

comúnmente debida a las serovariedades Hardjo y Pomona, están presentes la infección fetal en vacas gestantes con presencia de abortos o nacimientos prematuros y becerros débiles (Faine, *et al.*, 2000; Matos *et al.*, 2001).

Patogénesis

Las leptospiras son capaces de infectar a una amplia variedad de huéspedes mamíferos (Shang *et al.*, 1996). Las leptospiras patógenas son altamente móviles y son organismos altamente invasivos, que rápidamente se diseminan a los órganos blanco, después de su entrada al huésped usualmente a través de abrasiones en la piel o por membranas mucosas (Matsunaga *et al.*, 2003) (Figura 1).

El microorganismo se replica en la sangre carente de anticuerpos y se difunde rápidamente, después de 48 horas se le encuentra en órganos como riñón, hígado, pulmón, corazón y músculo esquelético (fase leptospirémica de la enfermedad). Entre los días 5 y 7, los anticuerpos específicos formados favorecen la opsonización del microorganismo que deja de ser encontrado en la sangre localizándose en túbulos contorneados renales y se inicia la eliminación por la orina durante semanas o meses (fase crónica inmune o de leptospiruria). La enfermedad se transmite también por vía transplacentaria, digestiva, mamaria, cutánea, por contacto con agua, lodos o alimentos contaminados, siendo el período de incubación variable entre 5 y 14 días, con un máximo de 21 días (Rossetti *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2000 y Levett, 2001).



Figura 1. La interacción de *Leptospira* con el medio, con el hombre y con animales susceptibles.

Diagnóstico

Para realizar el diagnóstico de leptospirosis, es necesario considerar que se pueden tomar en cuenta dos fases que pueden superponerse:

- Fase "A" Leptospiremia, o fase febril. Se pueden aislar microorganismos de sangre y órganos (hígado, bazo). Dura 7 a 10 días. Las leptospiras se puede aislar por cultivos directos o por inoculación en hámsteres o cobayos jóvenes. Después de 7 días aparecen anticuerpos aglutinantes específicos en sangre (reacción serológica).
- Fase: "B" leptospiruria, de inmediato a la anterior. El aislamiento se realiza en la orina.

Los métodos más comunes para el diagnóstico de leptospirosis son: detección de anticuerpos específicos, detección del ADN del microorganismo y por aislamiento del mismo (Natarajaseenivasan *et al.*, 2004).

En la primera fase de la enfermedad se puede cultivar a *Leptospira* a partir de la sangre y líquido céfalo-raquídeo (LCR); durante la segunda y tercera fase a partir de la orina. La bacteria puede excretarse hasta por 11 meses o incluso años después del diagnóstico serológico. El diagnóstico serológico puede establecerse con la prueba de aglutinación macroscópica, la cual es poco sensible y específica; o con la aglutinación microscópica (AM), que es más laboriosa, pero es específica (Levett, 2001).

La historia de exposición del paciente puede ayudar a integrar el diagnóstico diferencial. El diagnóstico de laboratorio definitivo de leptospirosis requiere del aislamiento del organismo en un espécimen clínico o un incremento de cuatro veces en los títulos de la prueba de aglutinación microscópica (AM) en el marco de un cuadro clínico apropiado. El método diagnóstico frecuentemente usado para la leptospirosis ha sido la serología. Debido a su alto grado de sensibilidad y especificidad, la AM es la prueba serológica usada en los laboratorios de referencia para el diagnóstico de infección sistémica (Priya *et al.*, 2003). Sin embargo, la AM es una prueba compleja que exige un panel grande de suspensiones de leptospiras vivas de diversas serovariedades para proporcionar una cobertura adecuada de la diversidad antigénica representada en un área determinada. Niveles de anticuerpos detectables por AM no aparecen antes de los días 6 o 7 después de la aparición de síntomas; normalmente estos niveles de anticuerpos alcanzan el punto máximo por la cuarta semana, pero los títulos pueden persistir durante años. La interpretación de los resultados es difícil sin la colección de muestras pareadas en los momentos apropiados; por consiguiente, los resultados normalmente no son disponibles lo suficientemente rápido para el correcto cuidado del paciente (Bajani *et al.*, 2003).

El diagnóstico de *Leptospira* depende de la integración de pruebas diagnósticas simples, que en ocasiones no son claras como aglutinación AM, microscopia de campo oscuro para observar al organismo en sangre u orina es también llevada a cabo, sin embargo son frecuentes los errores de interpretación debido al riesgo para confundir a leptospiras con restos de fibrina u otros artefactos. Los laboratorios de diagnóstico de leptospirosis pueden hacer cualquiera de las pruebas para mostrar el organismo o por pruebas serológicas que detectan anticuerpos leptospirales, por rutina las pruebas de laboratorio sólo sugieren un diagnóstico de leptospirosis, por lo que se necesita examinar el carácter antigénico de estos patógenos por otros métodos, como los métodos moleculares (Brown *et al.*, 1991; Barthi *et al.*, 2003).

Cultivo

La prueba diagnóstica definitiva es el aislamiento de leptospiras de especímenes clínicos, sin embargo, el cultivo es lento y con bajas probabilidades de éxito. La demostración del microorganismo mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, hibridación *in situ* detección del ADN, mediante PCR o puede ser también utilizada para el diagnóstico. Los procesos para cultivar a *Leptospira* han cambiado muy poco en los años recientes, las leptospiras pueden ser aisladas de sangre durante los primeros 7 a 10 días de la enfermedad y de orina durante la segunda y tercera semanas de la enfermedad, el cultivo de estas muestras es lento requiriéndose de varias semanas de incubación (Barthi *et al.*, 2003).

El medio sintético EMJH con albúmina sérica bovina y polisorbato 80 (Tween 80) es considerado un medio superior a los medios de cultivo que contienen suero de conejo como constituyente de enriquecimiento. Los ácidos grasos libres, producto de la hidrólisis espontánea de los enlaces ésteres del Tween 80, son tóxicos para las leptospiras a concentraciones relativamente bajas. La albúmina permite el desarrollo de las células en mayores niveles de Tween 80 dado su carácter destoxicante y estabilizador, al ser capaz de unir a su estructura los ácidos grasos libres en el medio de cultivo y de esta forma neutralizar su actividad citolítica. Este medio es actualmente el más utilizado para el aislamiento y cultivo de cepas de *Leptospira*, en ocasiones en grandes volúmenes durante la obtención de inóculos para la producción de antígenos vacunales en medio libre de proteínas. Sin embargo, el alto costo de sus componentes, en particular la albúmina sérica bovina, incrementa significativamente los costos de producción de vacunas y las investigaciones básicas de laboratorio (González *et al.*, 2002).

Serología

La serología es el método más usado comúnmente para el diagnóstico de la leptospirosis. La prueba de AM es la prueba de referencia estándar ya que es sensible y específica. La AM detecta anticuerpos aglutinantes principalmente IgM en suero, los cuales aparecen de los 7 a los 10 días de iniciada la infección. Por otro lado, la detección de anticuerpos no es una garantía de infección activa, debido a la amplia distribución de *Leptospira* en la naturaleza. Por este motivo, el diagnóstico serológico requiere de la detección de un incremento en 4 veces el título inicial de anticuerpos, en una segunda muestra de suero colectada 14 días posteriores a la primera toma (Barthi *et al.*, 2003). La prueba de ELISA tiene la ventaja de proveer información como el isotipo (IgG o IgM) del anticuerpo que está reaccionando con el antígeno de *Leptospira*. Esto puede realizarse cuando se intenta determinar si el anticuerpo presente en sueros de pacientes proviene de una infección actual o es resultado de infecciones pasadas y esto puede ser una opción particularmente en áreas del mundo donde la leptospirosis es endémica (Faine *et al.*; 2000).

Métodos Moleculares

Una forma de demostración indirecta de leptospirosis en muestras clínicas es el diagnóstico basado en la detección de su ADN mediante técnicas de hibridación o mediante PCR. Una gran cantidad de ensayos de PCR y PCR en tiempo real para detectar leptospirosis en muestras clínicas y medio ambientales han sido reportados. Estos ensayos de PCR son muy sensibles reportando detección de cuentas tan bajas como 10 a 100 organismos. En estudios recientes, técnicas de PCR han sido capaces de detectar cuentas de 10^3 leptospirosis como mínimo, haciendo además énfasis en la importancia de extracción de ADN a partir de muestras frescas (*Castillo SLO y Ramírez HJM)

* Comunicación personal

y algunos métodos pueden diferenciar entre especies patógenas y no patógenas de *Leptospira* (Barthi *et al.*, 2003).

Tratamiento

El tratamiento de la leptospirosis difiere dependiendo de la severidad y duración de los signos o síntomas al tiempo de presentación. Los humanos, pacientes que presentan leptospirosis icterica más severa, requieren de hospitalización y permanecer en observación. El tratamiento con 6.000.000 UI/día de penicilina G en adultos puede ser efectivo incluso después del quinto día de enfermedad. Se ha empleado también con efectividad doxiciclina en dosis de 100 mg cada 12 horas, durante 7 días. Además de la quimioterapia específica son necesarias las medidas sintomáticas, la corrección de las alteraciones hemodinámicas, del equilibrio hidroelectrolítico, la asistencia renal y otras medidas de soporte vital (Matsuo *et al.*, 2000; Faine *et al.*, 2000).

En el ganado se puede utilizar el siguiente tratamiento:

Antibióticoterapia: Los antibióticos indicados son penicilina, estreptomina y dihidroestreptomina. La estreptomina que es eliminada por vía renal, actúa sobre leptospirosis alojadas en los túbulos contorneados y elimina los estados de portador.

Inmunidad

Se ha mencionado que la inmunidad contra leptospirosis es principalmente humoral y es específica de la serovariedad infectante; usualmente, la inmunización protege contra la enfermedad causada por la serovariedad homóloga o serovariaciones antigénicamente similares (Rossetti *et al.*, 1999; Levett, 2001; Abdulkader *et al.*, 2002).

Dadas las graves pérdidas económicas y humanas causadas por esta enfermedad justifican el uso de vacunas profilácticas en poblaciones humanas y animales bajo riesgo de infección e incluso en núcleos de población humana en riesgo (González *et al.*, 2003). La inmunización ha sido ampliamente utilizada en humanos y animales con un éxito limitado; primero las vacunas fueron compuestas de suspensiones de cultivos de leptospiras muertas en un medio conteniendo suero y los efectos secundarios eran comunes. Las vacunas de uso veterinario actualmente son preparadas utilizando medio enriquecido con albúmina. En el caso de vacunas de uso humano, son elaboradas con cultivos desarrollados en medios libres de proteína animal y generalmente no presentan efectos adversos (Levett, 2001).

La identificación de las serovariedades específicas, es importante ya que las bacterinas protegen contra las serovariedades que están incluidos en ellas. Las bacterinas no protegen contra la infección renal y la iniciación del estado de portador; aunque desde el punto de vista clínico permanecen asintomáticos. El efecto protector de las bacterinas produce en bovinos: disminución de los abortos y de la mortalidad de terneros (Levett, 2001).

La especificidad de la serovariedad esta conferida por el lipopolisacárido (LPS) (Levett, 2001). Variaciones en la cadena de carbohidratos del lipopolisacárido (LPS) son responsables de la diversidad antigénica observada entre las serovariedades de *Leptospira* (Guerreiro *et al.*, 2001; Koizumi *et al.*, 2004). El LPS ha sido identificado como el más significativo antígeno para *Leptospira* que por sus propiedades químicas y biológicas difiere de otros LPS de bacterias Gram negativas (Midwinter *et al.*, 1994). Es considerado también el único antígeno protector identificado a la fecha. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra el LPS, son opsonizantes, inducen fagocitosis, aglutinan leptospiras y protegen pasivamente animales contra el desafío (Yan *et al.*, 1999).

Las proteínas de la membrana externa (PME) de *Leptospira* incluyen proteínas transmembranales, como la porina OmpL1 y lipoproteínas como LipL21, LipL41, LipL32 y LipL36. Las PME que están expuestas en la superficie de *Leptospira* son potencialmente relevantes en la patogénesis por su localización (Haake *et al.*, 1998). Resultados obtenidos en estudios recientes usando OmpL1 y LipL41 recombinantes que indujeron protección sinérgica en un 75% de los animales desafiados sugieren que varias de las PME de leptospiras patógenas son altamente conservadas y el potencial para utilizarlas en bacterinas, pudiera generar una amplia inmunidad de protección cruzada (Haake, *et al.*, 1999; Koisumi *et al.*, 2003).

Después de la extracción con tritón X-114, resultados demuestran que LipL21 es un componente de la membrana externa de *Leptospira*. Aunque resulta de interés el que durante el fraccionamiento de la membrana, LipL21 no podía ser detectada extrañamente a diferencia de otras proteínas de membrana externa como LipL36 y LipL 41. El reconocimiento de LipL21 recombinante por muestras de sueros de pacientes y hámsteres sugieren que LipL21 es expresada durante la infección tanto en pacientes como en hámsteres (Cullen *et al.*, 2003).

Una proteína de 32 kDa fue identificada como el antígeno proteico inmunodominante con el que se tuvo una mejor utilidad serodiagnóstica. Este antígeno fue identificado como LipL32, una proteína de membrana externa cuya expresión es conservada entre especies patógenas de *Leptospira* (Haake *et al.*, 2000).

Microbiología de *Leptospira*

El agente etiológico de la leptospirosis pertenece al orden *Spirochaetales*, familia *Leptospiraceae* y género *Leptospira*. Son bacterias con pared celular de organización similar al de las bacterias Gram negativas. Las

leptospiras son espiroquetas flageladas, usualmente miden de 0.1 a 0.2 μm por 6 a 20 μm , pero pueden ser más largas. Son bacterias flexibles, helicoidales, con los extremos en forma de gancho y dos flagelos periplasmáticos que les permite tener movilidad (Figuras 2 y 3). Las leptospiras muestran tres formas distintas de movimiento, rotación, contorsión y translación (Levett, 2001).

Las leptospiras son organismos aerobios obligados con un óptimo desarrollo *in vitro* a temperaturas de 28 a 30° C. Crecen en medio simple enriquecido con vitaminas (vitaminas B₂ y B₁₂ son factores de crecimiento), ácidos grasos de cadena larga y sales de amonio. Los ácidos grasos de cadena larga son utilizados como única fuente de carbono y son metabolizados por β -oxidación (Levett, 2001).

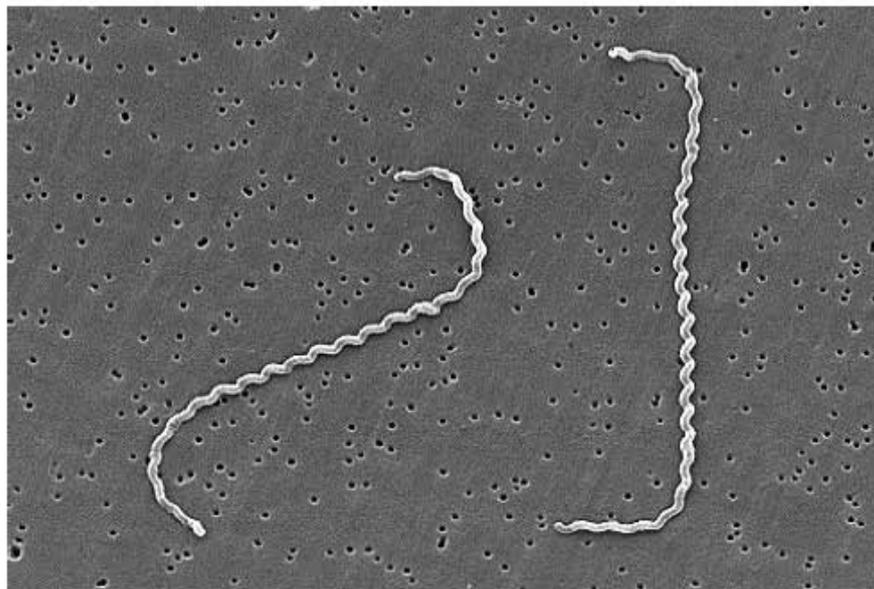


Figura 2. Microfotografía electrónica de *Leptospira*.

Fuente: Levett, 2001

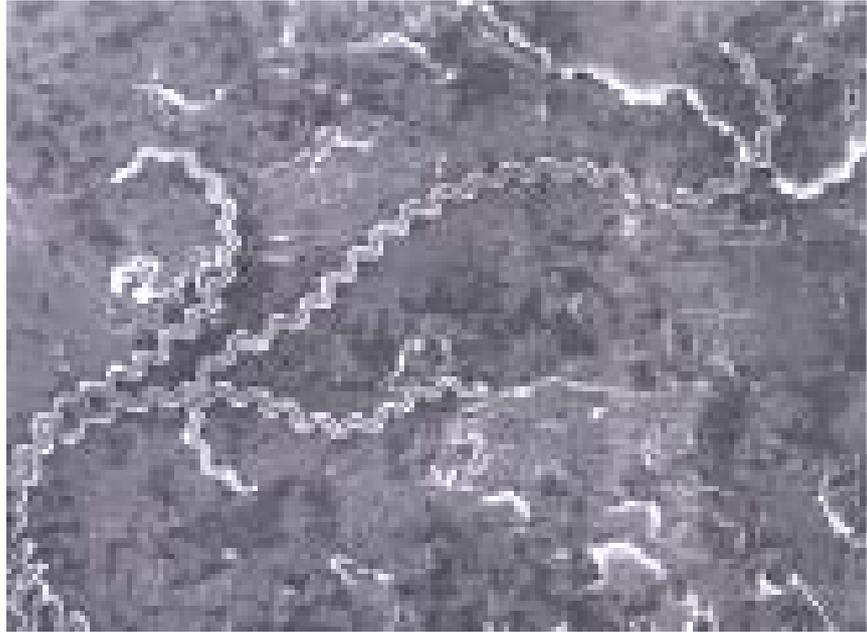


Figura 3. Microfotografía de *Leptospira*. Se aprecian su forma de espiral y sus extremos en forma de gancho.

Fuente: Barthi *et al.*, 2003

El genoma de *Leptospira* consiste de 2 cromosomas circulares y su secuencia completa fue establecida recientemente (P He *et al.*, 2005) para las serovariedades *Lai* y *Copenhageni* (Nascimento *et al.*, 2004).

El genoma es largo comparado con el de otras espiroquetas como *Treponema* y *Borrelia*, lo cual podría asociarse con la habilidad de *Leptospira* para sobrevivir dentro de diversos ambientes: huésped animal y libremente en el medio. Poco se conoce sobre el intercambio genético entre *Leptospira*, aunque la transferencia lateral ha sido sugerida (Barthi *et al.*, 2003).

Taxonomía y Clasificación

El género *Leptospira* se encuentra comprendido por 3 especies saprofitas y 9 especies patógenas. Paralelamente, se reconoce una clasificación antigénica organizada en 23 serogrupos y más de 250 serovariedades (Barochi *et al.*, 2001; Trueba *et al.*, 2004; Natarajaseenivasan *et al.*, 2005).

Aunque en los últimos años han sido introducidos una gran variedad de modernos métodos para el análisis genético, tipificación de cepas de *Leptospira*, estos no están al alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos de los países en desarrollo debido a su alto costo. La clasificación serológica mediante la técnica de aglutinación microscópica con el empleo de antisueros policlonales de conejo sigue siendo el método más utilizado a pesar de ser laborioso y limitado para la clasificación hasta serovariedad, si no se dispone de una batería de anticuerpos monoclonales (González *et al.*, 2002).

- Clasificación serológica: Para antes de 1989, el género *Leptospira* fue dividido en dos especies, *L. interrogans*, comprendiendo todas las cepas patógenas y *L. biflexa*, conteniendo las cepas saprofitas del medio ambiente. *L. interrogans* y *L. biflexa* fueron divididas en numerosas serovariedades definidas por aglutinación, seguido de absorción cruzada con antígenos homólogos (Matsuo *et al.*, 2000).
- Clasificación genotípica: En la clasificación genotípica de *Leptospira* se reconocen nueve genomoespecies de leptospiros patógenas. La heterogeneidad genética fue demostrada hace algún tiempo y estudios de hibridación de DNA definieron 9 especies patógenas de *Leptospira*: *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. weili* y 3 apatógenas: *L. biflexa*, *L. meyeri* y *L. wolbachii*.

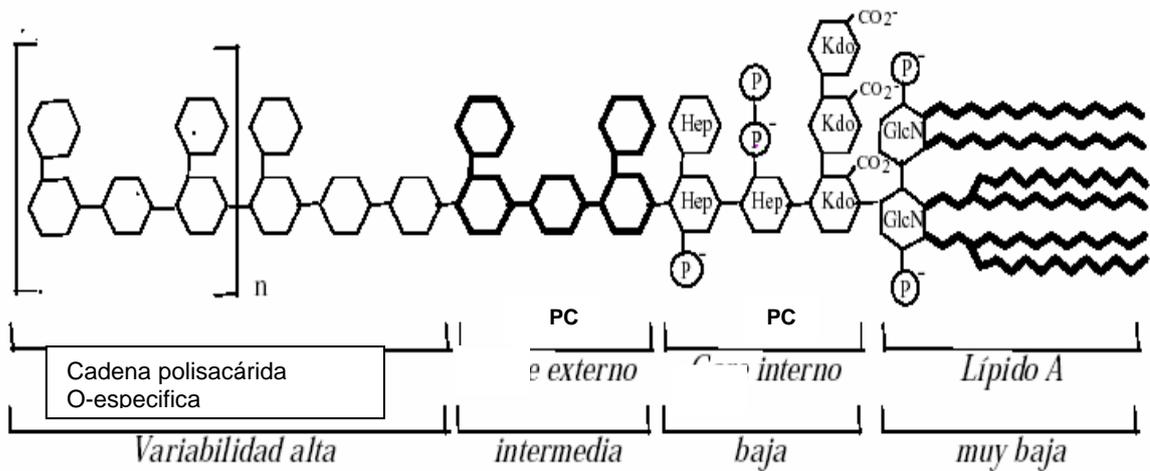
Lipopolisacárido o endotoxina

Desde que se confirmó el papel del LPS como causa principal del choque inducido por bacterias Gram negativas, muchos han sido los estudios que se han realizado para intentar establecer los mecanismos generados en la respuesta del organismo. Dada su actividad biológica, el LPS ha sido también llamado endotoxina. Esta endotoxina consiste en un fosfoglicolípido anclado a la membrana externa (ME) bacteriana (lípid A), unido covalentemente a un heteropolisacárido hidrofílico, que confiere especificidad antigénica a la molécula (Bermejo *et al.*, 2003).

El heteropolisacárido comprende dos regiones: la cadena O-específica también llamada antígeno O, formada por unidades repetitivas de oligosacárido; y el polisacárido central. Éste a su vez se subdivide en polisacárido central externo (formado por hexosas), mediante el cual se une al antígeno O; y el polisacárido central interno (formado por heptosas) mediante el cual se une al lípido A; así éste se une a esta porción mediante el ácido 2-keto-3-deoxioctanoico (KDO). La variabilidad del LPS juega un papel importante en cuanto a la capacidad inmunogénica (polisacárido) y tóxica (lípido A) de la célula (Figura 4) (Bermejo *et al.*, 2003).

La amplia diversidad de las serovariedades entre las leptospiras patógenas ha sido atribuida principalmente a diferencias en la estructura, más que a la composición, de sus LPS. Muchos trabajos se han enfocado en el papel del LPS de *Leptospira* en la inmunidad (Cullen *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2004).

La membrana externa de las leptospiras al igual que la de las bacterias Gram negativas contiene LPS, proteínas de membrana externa (PME) entre las que se han descrito varias lipoproteínas. Los LPS son altamente inmunogénicos y son responsables para la especificidad antigénica en bacterias como *E. coli* y *Salmonella*, así como *Leptospira* (Levett 2001). Por otro lado, la diversidad de serovariedades asociadas con leptospirosis en diferentes especies animales y áreas geográficas ha hecho necesaria la elaboración de bacterinas específicas para área y especie animal. Por esta razón es necesario desarrollar estrategias alternativas de vacunación, así como buscar el mejor entendimiento de las proteínas de membrana externa (Haake *et al.*, 1998).



*Polisacárido central (PC)

Fuente: Bermejo *et al.*, 2003

Figura 4. Estructura del LPS.

Proteínas de membrana

Las espiroquetas de manera similar a las bacterias Gram negativas, poseen una membrana citoplásmica, peptidoglicano y una membrana externa (Trueba *et al.*, 1992). La membrana plasmática de la célula es una estructura altamente diferenciada que contiene proteínas específicas que ayudan a controlar el medio intracelular e interactúan con moléculas específicas para influir en la fisiología celular (Darnell, 1993).

Aproximadamente la mitad de la masa de la membrana esta constituida por fosfolípidos que espontáneamente se organizan para formar una bicapa lipídica. Todas las membranas de la célula, incluso la membrana plasmática, también contienen proteínas (Bolsover *et al.*, 2004).

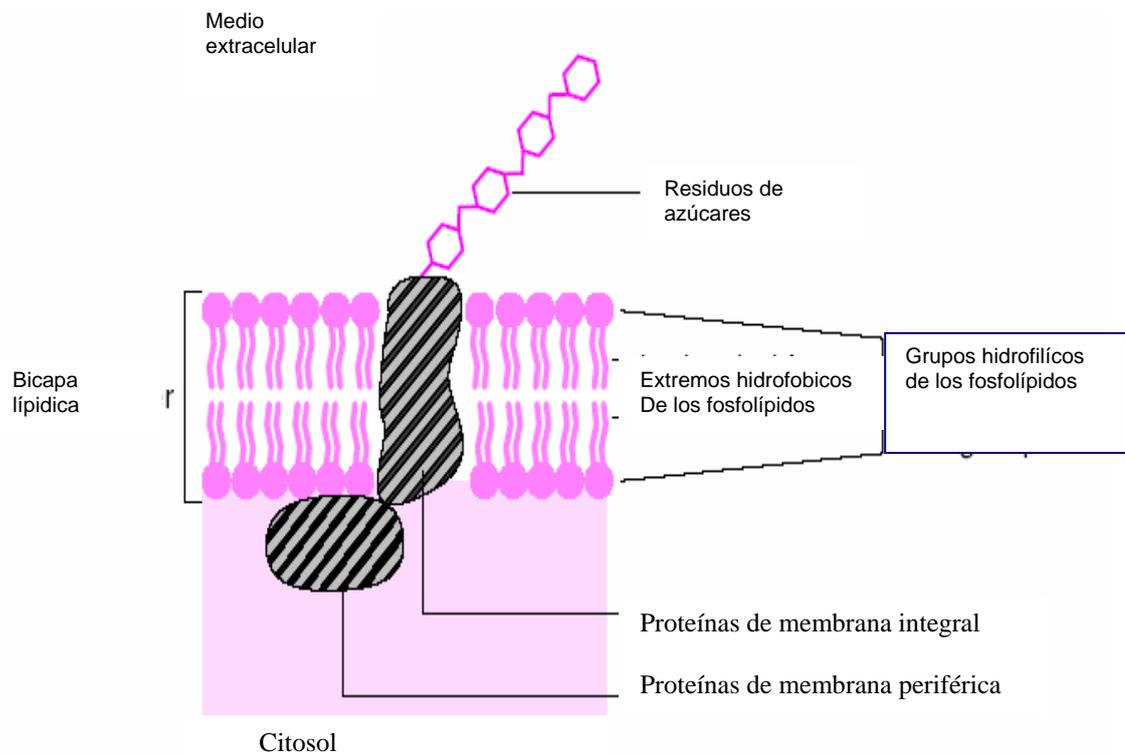
Cada membrana celular tiene la misma estructura básica de bicapa fosfolipídica, un grupo distinto de proteínas de membrana permite a cada membrana subcelular llevar a cabo sus funciones distintivas. Todas las membranas independientemente de sus orígenes, contienen tanto proteínas como lípidos. La relación proteína – lípido varía enormemente: la membrana mitocondrial interna contiene un 76% de proteína; la membrana mielínica, tan sólo 18% (Darnell, 1993).

Las proteínas pueden ligar otras moléculas de proteína, ADN o ARN, polisacáridos, lípidos y un gran número de otras moléculas pequeñas como los iones inorgánicos pueden unir incluso gases tales como el oxígeno, nitrógeno y el óxido nítrico. Los sitios de unión, son usualmente muy específicos para un ligando particular, aunque el grado de especificidad puede variar ampliamente. Usualmente, la unión es reversible para que haya un equilibrio entre el ligando libre y el que no lo es. Un sitio de unión es usualmente una hendidura en la superficie de la molécula de la proteína, que está hecha de una cadena de aminoácidos apropiadamente posicionada para realizar interacciones

específicas con el ligando. Todas las fuerzas que estabilizan las estructuras terciarias de las proteínas son también usadas en la interacción ligando-proteína: puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, efectos hidrofóbicos y las fuerzas de Van der Waals las cuales son débiles uniones intermoleculares, todos tienen su papel (Bolsover *et al.*, 2004).

En una proteína periférica los aminoácidos polares (hidrofílicos) predominan en la superficie, mientras que los no polares (hidrofóbicos) están ocultos en su interior. El papel de la superficie hidrofóbica es el de interactuar con los lípidos que sirven como una especie de anclaje o inserción en la bicapa (Karp, 1992) (Figura 5).

Las membranas bacterianas, al igual que las de las células eucarióticas, están constituidas por una bicapa lipídica en la que se intercalan proteínas, lipoproteínas y fosfolípidos. Las bacterias Gram negativas, tienen una membrana citoplasmática y una membrana externa que se localiza sobre la pared celular (Flannery *et al.*, 2001).



Fuente: Bolsover *et al.*, 2004

Figura 5. Se muestra la bicapa lipídica, con presencia de proteínas de la membrana interna y externa.

La arquitectura espiroquetal difiere significativamente de las bacterias Gram negativas en que la capa de peptidoglicano de las espiroquetas esta asociada a la membrana citoplásmica más que a la membrana externa (Haake *et al.*, 2002).

Un enfoque importante en la investigación de *Leptospira* es la identificación de proteínas de la membrana externa y su participación en la patogénesis de la leptospirosis.

En virtud de su localización sobre la superficie celular, las proteínas de la membrana externa de *Leptospira* son probablemente relevantes para una comprensión de la interacción huésped-patógeno. En particular la membrana externa y/o componentes de la superficie expresados por leptospirosas probablemente facilitan la colonización de la superficie apical de las células epiteliales en los túbulos proximales del riñón (Barnett *et al.*, 1999).

Para el aislamiento de la membrana externa se ha utilizado duodecil sulfato de sodio (SDS) y extracción con tritón X-114. Se tienen 3 clases de proteínas leptospirales descritas: transmembranal, lipoproteína y proteínas periféricas de membrana. OmpL1 fue la primera proteína de membrana externa en ser descrita y se predijo que tiene al menos 10 segmentos transmembranales de hojas β , que probablemente participan en su movilidad electroforética modificable con el calor. Existe evidencia de que OmpL1 crea canales similares a porinas en el plano de la bicapa lipídica (Haake *et al.*, 2002).

Una clase de proteínas de ME y las más abundantes son las lipoproteínas (Hsieh *et al.*, 2005), las cuales son un componente universal en las membranas de las eubacterias. Algunas de las funciones de estas lipoproteínas son como adhesinas, enzimas, transportadores, proteínas de unión, toxinas y una variedad de otras capacidades esenciales para la virulencia (Setubal *et al.*, 2006). Las lipoproteínas se encuentran ancladas a la membrana externa por ácidos grasos sujetos a una cisteína amino-terminal. Análisis de la fase detergente de extractos de *Leptospira kirschneri* con tritón X-114 indicaron que al menos en la membrana externa hay 5 lipoproteínas. Los genes que codifican lipoproteínas de la membrana externa leptospiral LipL21,

LipL32, LipL36, LipL41 y LipL45 han sido descritos, LipL32 es la proteína más prominente en el perfil de proteínas leptospirales y es el antígeno proteico inmunodominante durante la leptospirosis en humanos (Haake *et al.*, 2002).

LipL41 es una lipoproteína expuesta en la superficie que provee inmunoprotección sinérgica con OmpL1. Recientemente la proteína P31_{LipL45} de membrana periférica fue descrita, representa el tercer tipo de proteínas de membrana leptospiral. P31_{LipL45} es exportada como una lipoproteína de 45 kDa y procesada a una forma C-terminal de 31 kDa que esta asociada con la membrana externa (Haake *et al.*, 2002).

El LPS de *Leptospira* puede inducir inmunidad protectora, pero esta inmunidad es generalmente específica a la serovariedad, consecuentemente el enfoque de la investigación sobre inmunidad contra leptospirosis se ha cambiado y enfocado hacia el estudio de las PME, que pueden ser capaces de estimular inmunidad heteróloga (Cullen *et al.*, 2002). Como es posible predecir la localización subcelular de las proteínas por programas disponibles en línea, la predicción de las proteínas de membrana se hace de acuerdo a la presencia de dominios transmembranales llamados helices- α , las proteínas de membrana externa a menudo abarcan la membrana como estructuras de barriles- β los cuales tienen un valor de hidrofobicidad negativa similar al de las proteínas citoplasmáticas (Pávková *et al.*, 2005).

Una proteína de 64 kDa purificada ha sido caracterizada como un antígeno común, ampliamente distribuido entre algunas bacterias y que se origina bajo la superficie de *Leptospira* (Faine *et al.*, 2000). Durante el choque térmico, se expresan proteínas altamente conservadas denominadas proteínas de choque térmico (Khandekar *et al.*, 1993). Varios reportes implican a varias proteínas de choque térmico como el antígeno causal en una variedad de enfermedades autoinmunes; estas proteínas han sido clasificadas como chaperonas moleculares o ATP-dependientes de proteasas; las chaperonas moleculares facilitan la propiedad de plegamiento de polipéptidos sintetizados

recientemente y ayudan a las proteínas dañadas térmicamente a recuperar una conformación biológicamente activa, mientras que las proteasas degradan proteínas que no han podido ser rescatadas por las acción de la chaperona (Simao *et al.*, 2005).

La familia de proteínas GroEL son de interés ya que son uno de los mayores antígenos de un número de bacterias patógenas. En humanos con infección por *Bartonella bacilliformis*, GroEL es uno de los antígenos reconocidos por la respuesta inmune humoral (Haake *et al.*, 1997), que se encuentra asociado a la membrana externa (Phadnis *et al.*, 1996).

El cambio de temperatura de *L. biflexa* serovariedad Patoc desde 30° C a 37° C mostró la expresión de 19 nuevas proteínas de choque térmico y en *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjo con cambio de temperatura de 30° C a 37° o 42° C se sintetizaron 7 proteínas de choque térmico; entre ellas proteínas similares a GroEL y DnaK de *E. coli* y otras bacterias. En el Cuadro 1 se enlistan algunas de las proteínas conocidas de *Leptospira* (Faine *et al.*, 2000).

Cuadro 1. Antígenos proteícos de *Leptospira*, reconocidos por suero hiper-inmune o de pacientes convaleciente.

kDa	Localización	Especificidad	Serovariedad
33, 34, 37	Flagelo	De género	Hardjo
35	Envoltura externa	De especie	Copenhageni
30 - 67	Desconocida o inespecífica	Desconocida o inespecífica	Varias
62	Superficie	De género	Kremastos
64	Proteína de choque térmico	General	Hardjo
31, 36, 41	PME porinas	Desconocida o inespecífica	Grippotyphosa (<i>L. kirschneri</i>)

Fuente: Faine *et al.*, 2000

ANTECEDENTES

En el año de 1996 Banda *et al.*, reportaron una proteína de 60 kDa reactiva contra un suero de bovino positivo a la serovariedad Hardjo con un título de anticuerpos de 1:800 en la prueba de aglutinación microscópica. Las proteínas de *L. interrogans* de las serovariedades Bratislava, Canicola, Hardjo, Grippotyphosa, Panama, Pomona, Tarassovi y Wolffi, fueron probadas por inmunotransferencia tipo “Western” y dicha proteína fue observada en todas estas serovariedades (Banda *et al.*, 1996).

Por lo anterior, estos hallazgos dejan la incógnita de que tal proteína se encuentre primeramente en la membrana externa de *Leptospira* y de ser así pueda tener un papel antigénico, lo cual hace relevante conocer la identidad de dicha proteína.

Al conocer la secuencia peptídica de esta proteína, se podrá observar su homología con otras proteínas y eventualmente sus propiedades bioquímicas.

HIPÓTESIS

Alguna de las proteínas antigénicas de 60 kDa de la serovariedad Hardjo de *Leptospira borgpetersenii* se localiza sobre la membrana externa.

OBJETIVOS GENERALES

- Identificar una proteína de 60 kDa en la membrana externa de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo.

ESPECIFICOS

- Detectar una proteína de 60 kDa mediante inmunotransferencias con sueros de bovinos convalescientes a leptospirosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de la bacteria

Leptospira interrogans serovariedad Hardjo se cultivó en frascos con 50 ml de medio Ellinghausen McCollough modificado por Johnson y Harris (EMJH) y se incubó^a a 30° C durante 8 a 12 días hasta llegar a un conteo de 2×10^8 células/ml para realizar la extracción de proteínas de membrana externa.

Extracción de PME

La extracción de PME se realizó de acuerdo al método utilizado por (Cullen *et al.*, 2003) modificado por Matsunaga con ligeras modificaciones. Primeramente se obtuvo la bacteria, así que los cultivos bacterianos se centrifugaron^b 2 veces 10 min a 4° C a 10, 000 x g, se resuspendió la pastilla en el mismo volumen con PBS-5mM y MgCl₂ (ver apéndice) frío, se distribuyeron en volúmenes de 1.5 ml en tubos eppendorf de 1.7 ml, se centrifugaron^b 2 min a 10,000 x g a 4° C, el sobrenadante y fue removido junto a las pastillas resuspendidas en un total de 450 µl de 2x TNE-PI (ver apéndice) frío + 450 µl de dH₂O y se mantienen tubos en hielo.

Para la extracción con detergente se adicionó a los tubos 100 µl de tritón X-114 frío y se agitaron durante 30 min a 4° C. Se centrifugaron^b después a 10, 000 x g a 4° C por 10 min para transferir enseguida el sobrenadante a un nuevo tubo conteniendo 20 µl de 1M CaCl₂, se mezclaron 100 µl más de tritón X-114 y se incubaron los tubos 10 min a 37° C .

^b Precision Scientific Co, Mod 4, EUA

^bSavant, Francia

Al término de la incubación se centrifugaron los tubos 10 min a 5, 000 x g a temperatura ambiente, transfiriendo después la fase superior a un nuevo tubo.

Para el lavado de las fracciones, se agregaron 200 µl de tritón X-114 frío a la fase superior y 800 µl de 1x TNE-PI y se incubaron ambas fases 10 min a 37° C, después se centrifugaron^a 10 min a 5, 000 rpm para separar las fases. En un tubo se transfirió la fase superior y en otro tubo se descartó la fase superior, se añadieron 1 y 3 volúmenes de acetona a cada una de las fases respectivamente, se mezcló en vortex^b y se dejó en agitación toda la noche a 4° C. Después se centrifugo^a a 13, 000 x g a 4° C durante 15 min y finalmente se removió el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 µl de 1x FSB/0.25mM PMSF (ver apéndice) y se almacenaron^c a -20° C.

Cuantificación de proteína

Las muestras siempre se mantuvieron en hielo, en la placa de ELISA se marcaron los pozos que se utilizarían para evitar alguna confusión, y la cuantificación^d se hizo por duplicado. La muestra se colocó en dos líneas de pozos, para 1 µl y para 2 µl o hasta 5 µl de muestra. En otra serie de pozos se pusieron diferentes diluciones para la curva de albúmina con PBS. Finalmente, se pone un pozo blanco con 100 µl de PBS.

^aSavant, Francia

^bThermolyne, Mod. M63215

^cFrigidaire

^dMicro BCA™ Protein Assay Kit

Separación electroforética de las PME en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS

A la preparación de PME se le agregó un volumen de solución amortiguadora de muestra (ver apéndice) la cual contiene 2-mercaptoetanol que ayuda a romper los enlaces disulfuro de la proteína, para que esta permanezca en su estructura primaria y así las proteínas puedan migrar a través de los poros del gel. La mezcla se sometió a ebullición durante 5 min.

Se preparó un gel de poliacrilamida-SDS al 12% de 1mm de grosor. La composición de los geles se realizó de acuerdo al manual del proveedor (Mini-protean II Electrophoresis cell) y los geles ya polimerizados se colocaron en la cámara de electroforesis^a. Se agregó solución amortiguadora (ver apéndice) para llevar a cabo la separación de las proteínas. En los pozos se puso una muestra de 20 µl de las PME y en un pozo se incluyó un marcador de peso molecular^b para la comparación de los pesos moleculares de las proteínas. El corrimiento del gel se llevo a cabo a 50 volts con una fuente^c de poder para el gel de concentración y posteriormente se aumentó el voltaje a 100 volts para el corrimiento del gel de separación, después de salir el colorante del gel se dejo 10 min más para su finalización.

Después de retirar los geles de la cámara de electroforesis se colocaron en una solución de azul de Coomassie (ver apéndice) durante toda la noche en agitación^d constante. Después, se retiró la solución de y se agregó solución desteñidora (ver apéndice), 2 cambios de 45 minutos aproximadamente cada uno, hasta que las bandas eran visibles. Se desechó la solución y se hicieron 2 lavados con agua destilada por 1 min, finalmente se envolvió el gel en papel celofán dulce para conservarlo deshidratado.

^aBIO RAD, Mod. Mini Protean II Cell

^bBIO RAD, Precision Plus Protein

^cPharmacia Biotech, Electrophoresis Power Supply

^dDual Action Shaker, Mod. 3508

Inmunodetección tipo Western

Continuando a la electroforesis, los geles de poliacrilamida-SDS al 12% fueron inmediatamente transferidos a una membrana de nitrocelulosa^a de porosidad de 0.45 μm en una cámara de electro-transferencia^b a 100 Volts durante 1 hora 40 minutos como se describe a continuación: al retirar el gel de los cristales de la cámara de electroforesis, se agitó el gel y la membrana de nitrocelulosa por separado en solución amortiguadora de Towbin (ver apéndice) SDS al 0.037% frío durante 30 minutos, después se hizo la colocación en forma de sándwich en la cámara de transferencia comenzando del lado del polo negativo: esponja, filtro, gel, membrana de nitrocelulosa, filtro y esponja, se cerró la cámara y se le agrego amortiguador de Towbin frío, la cámara por último fue colocada en un recipiente con hielo y se realizó la transferencia como se menciono anteriormente.

Después se retiro el gel y se tiño en azul de Coomassie para corroborar la transferencia adecuada y la membrana se colocó en TBS-T (ver apéndice) frío durante 30 min en agitación. Posteriormente la membrana se puso en 20 ml de TBS-T conteniendo suero de bovino positivo a *Leptospira* serovariedad Hardjo con títulos en la prueba de AM iguales o superiores a 1:800, en una dilución de 1:50 durante toda la noche. Al día siguiente se lavó la membrana en TBS-T y se colocó la membrana en el conjugado de peroxidasa diluido de 1:500 y se incubó durante 2 horas a 37° C. Al término de la incubación se lavó la membrana con TBS-T por 5 min y después se lavó con TBS por 5 min y otra por 10 min. Se continuó con la colocación de la membrana en un recipiente con TBS frío al cual se le agregó al mismo tiempo cloro naftol en metanol y peróxido de hidrógeno.

^aAmersham Life Science, Hybond-C

^bBIO-RAD, Trans – Blot Cell

Se cubrió el recipiente con papel aluminio y se agitó aproximadamente 15 minutos o hasta observación de bandas en la membrana. El revelado se detuvo con agua helada, la membrana se retiró y se dejó secar. En el ensayo utilizado con anti GroEL, se usó a una dilución de 1:20 000.

Electroelusión

La electroelusión de los geles de poliacrilamida se hizo para purificar la proteína con la cual se quería trabajar. Primeramente los geles se tiñeron con KCl 250 mM helado durante 5 minutos, y se observaron bandas tenues que nos dan la referencia de la proteína deseada. Con una hoja de bisturí, se cortaron las bandas de interés en fragmentos muy pequeños, los fragmentos de cada gel se colocaron en cada una de las columnas del aparato de electro-elusión, las cuales tienen buffer hasta el límite de la columna. Después de agregados los fragmentos de los geles en las columnas correspondientes se agregó el resto del buffer, las condiciones para la elusión de la proteína fueron: 8 mA / columna durante 3 horas ó 4 mA / columna por 16 horas.

Esto es, si se corre un gel de poliacrilamida-SDS con 2 geles, se utilizaron 2 columnas para los fragmentos del gel y se corrió^a la elusión a 16 mA / por 3 horas ó a 8 mA / 16 horas.

Al término, se retiró de la columna el adaptador de plástico con la membrana y se recuperó el contenido, aproximadamente entre 300 a 700 µl por cada columna y se almacenaron en congelación. Al tener un volumen de proteína eluída de aproximadamente 4 ml se concentró la proteína por centrifugación en filtros^b a 3, 000 rpm durante 25 minutos.

^aPharmacia Biotech, Electrophoresis Power Supply

^bMillipore, Amicon Ultra

Cuantificación de proteína por el método de Bradford:

Las preparaciones de proteínas fueron cuantificadas según el método de Bradford con ligeras modificaciones según se describe a continuación.

Se preparó el reactivo de Bradford (Apéndice de soluciones), se construyó una curva de estándares en el que se incluyó un estándar de albúmina a una concentración de 1mg/ml.

Tubo	0	1	2	3	4	5	6	7
Albúmina (μ l)	0	5	10	15	20	30	40	60
dH ₂ O (μ l)	100	95	90	85	80	70	60	40
Bradford (ml)	3	3	3	3	3	3	3	3

*El tubo 0 se utilizó como blanco.

Se utilizaron 3 tubos más para la muestra:

Tubo	1	2	3
Muestra	10 μ l	20 μ l	50 μ l
dH ₂ O	90 μ l	80 μ l	50 μ l
Bradford	3ml	3ml	3ml
Medición	0.006	0.014	0.043

La medición se realizó en un espectrofotómetro^a considerando que el coeficiente de absorvancia debe de ser de 0.6 en una longitud de onda de 595 nm.

^aBIO RAD, Mod. 3550

Separación de proteínas en gel de poliacrilamida en 2 dimensiones (2D-PAGE)

La electroforesis por gel de poliacrilamida ha sido usada como una herramienta específicamente aplicada para la separación y cuantificación de proteínas (Dunbar *et al.*, 1990; Fichmann *et al.*, 2000; Ready Strip Instruction Manual). Por otro lado, la doble dimensión 2D-PAGE es aplicada para la separación completa de proteínas en donde en la primera dimensión, las proteínas se separan de acuerdo a su punto isoeléctrico en un gel de poliacrilamida con un gradiente de pH que se obtiene por medio de amfolitos^a y una alta concentración de urea como agente desnaturizante (Fichmann *et al.*, 2000; Berkelman *et al.*, 1998; Görg *et al.*, 2003; Ready Strip Instruction Manual). Esta primera fase es seguida por la separación en la segunda dimensión en donde las proteínas son separadas de acuerdo a su masa molecular realizando otra electroforesis en poliacrilamida (Fichmann *et al.*, 2000, Görg *et al.*, 2003), en el Cuadro 2 se observa la secuencia en la elaboración de los geles en doble dimensión.

Entre otros usos comunes de la 2D-PAGE están el de purificar rápidamente una proteína específica separándola de otras de peso molecular semejante así como su secuenciación al ser cortada desde el gel (Fichmann *et al.*, 2000). Finalmente, el uso de la 2D-PAGE con tinción de plata provee uno de los mejores métodos para estimar la purificación de una proteína determinada (Fichmann *et al.*, 2000).

^aBIO RAD, Ampholites

Primera dimensión (enfoque isoeléctrico)

El proceso de separación en la primera dimensión cubre la IPG por la rehidratación de la tira de pH, aplicación de la muestra y enfoque isoeléctrico (Berkelman et al., 1998).

Para llevar a cabo la separación en la primera dimensión, se requiere un rango de pH apropiado para la muestra, algunos gradientes de pH usados son: 4-7 L (lineal), 6-11 L, 3-10 L, y 3-10 NL (no lineal)). Las tiras de IPG de pH 3-10 L, tienen un gradiente de pH lineal entre pH 3 y pH 10. La tira de IPG con pH 3-10 NL tiene un gradiente sigmoideal que da una resolución mejorada entre pH 5 y pH 7. Una tira de IPG con pH 3-10 desplegará el rango más amplio de proteínas en un solo gel 2-D. Los demás rangos de pH son usados para separaciones de mayor resolución en un rango de pH particular (Berkelman et al., 1998; Ready Strip Instruction Manual BIO-RAD).

Rehidratación

La rehidratación se realiza con uno de los métodos básicos que se describirán a continuación.

Método 1, rehidratación pasiva, es realizada con los carriles de rehidratación/calibración disponibles. Método 2, rehidratación activa, usa los carriles EIE. La muestra podría ser preparada en una solución amortiguadora conteniendo urea, detergentes zwitteriónicos y/o no iónicos, transporte de amfolitos, y agentes reductores. La óptima composición del amortiguador y la carga de proteína será dependiente de la muestra.

Amortiguador de muestra premezclados:

- 1) (9 M urea, 2% CHAPS, 70 mM DTT, 0.2% Bio-Lyte 3/10 amfolitos, 0.001% de azul de bromofenol).

Un amortiguador de muestra útil para algunas muestras esta en el Cuadro 2 abajo descrito. Los componentes de este amortiguador podrían ser optimizados por cada muestra individualmente.

- 1) Fuerza iónica. La concentración de sales totales en la muestra debe ser <10 mM y la corriente no debería exceder 50 μ A por tira.
- 2) Urea. La urea desnaturaliza y solubiliza las proteínas. 8 M es recomendado, pero concentraciones de hasta 9.8 M pueden ser requeridas para la solubilización completa de la muestra.
- 3) Transporte ó portador de amfolitos. Mejora solubilidad de la muestra y asegura conductibilidad uniforme durante el IEF sin alterar el gradiente de pH de la tira IPG. Bio – Lyte 3/10 es recomendado para tiras con rangos de pH ancho y estrecho.
- 4) Detergentes. Los detergentes ayudan en la solubilidad de la proteína y a minimizar la (agregación) de proteína. Usar solo detergentes zwitterionicos y/o no iónico, incluyendo CHAPS, SB 3 – 10 y Tween 20. La concentración combinada total de detergentes esta usualmente en el rango de 0.5 – 4%.
- 5) Agentes reductores. Son usados para cortar uniones disulfuro. DTT (10 – 100 mM) es el estándar actual, el DTT es cargado y migra a un pK (9.5) durante el EIE, que puede llevar a una pérdida de solubilidad de algunas proteínas. Reemplazando el DTT con un agente reductor sin carga, como la tributilfosfina (TBP, 2 mM) puede aumentar la solubilidad de la proteína y asegurar las condiciones de reducción durante el EIE.
- 6) Carga de la proteína. La cantidad total de proteína para carga por tira podría variar dependiendo de la muestra, el rango de pH y longitud de la tira y el sistema de detección utilizado. En algunos casos, la carga excesiva de proteína es aceptable para revelar proteínas poco

abundantes de interés. En general lo máximo que puede ser cargado es 500 µg para tiras de 7 cm, 1 mg para 11 cm, 3 mg para 17 cm/18 cm y 4 mg para tiras de 24 cm.

- 7) Temperatura. No se deben calentar las proteínas de la muestra conteniendo anteriormente urea a 30° C, esto puede causar cambios en los valores debido a la carbamitación de la proteína (Ready Strip Instruction Manual BIO-RAD).

Método 1: Rehidratación pasiva

1. Preparar muestra en amortiguador de rehidratación de muestra.
2. Pipetear el volumen indicado de cada muestra como una línea a lo largo del borde de atrás en un canal en un carril de rehidratación. La línea de muestra deberá extenderse a lo largo de la longitud del canal excepto por cerca de 1 cm al final. Tener cuidado de no introducir burbujas, pueden interferir con la correcta distribución de la muestra en la tira.

7 cm 11 cm 17 cm 18 cm 24 cm

Volumen de rehidratación 125 µl 185 µl 300 µl 315 µl 410 µl

3. Cuando todas las muestras de proteína han sido cargadas en los carriles, retirar la cubierta de la tiras usando unas pinzas.
4. Con cuidado colocar la tira con el lado que tiene el gel hacia abajo. El (+) y el rango de pH marcado en la tira deberán ser legibles. Tener cuidado de no llevar la muestra hacia el apoyo plástico de las tiras, esta porción de la muestra no será absorbida por el material de gel. Tener cuidado de no dejar burbujas bajo la tira, en caso de que haya burbujas, con unas pinzas se puede levantar la tira ligeramente del lado del plástico y del final de la tira se sacarán las burbujas que están debajo de la tira.
5. Agregar en la cubierta de la tira 2 – 3 ml de aceite mineral para prevenir la evaporación durante el proceso de rehidratación. Agregar el aceite

mineral despacio y con cuidado sobre el lado plástico de las tiras, mientras se mueve la pipeta a lo largo de la tira.

6. Cubrir el tren de rehidratación con su tapa plástica y dejarla toda la noche (11 – 16 hrs.) en un lugar nivelado, para rehidratar las tiras IPG y la carga de la muestra de proteína.
7. Tener un lugar limpio, el PROTEAN debe estar seco, el tren para enfocar el EIE estará en el interior del laboratorio.
8. Usando pinzas, colocar una esponja en ambos extremos de los canales cubriendo los alambres o cables de los electrodos.
9. Agregar 8 μ l de agua desionizada en cada esponja para humedecerlos. Reajustar su posición si es necesario.
10. Remover la cubierta del tren de rehidratación conteniendo las tiras IPG. Usando pinzas, con cuidado sujetar la tira verticalmente por cerca de 7 – 8 seg. y levantar la tira en una pieza de papel filtro para permitir el escurrimiento del aceite, después transferir la tira IPG al canal correspondiente en el tren de enfoque (manteniendo el lado del gel hacia abajo). Hay que recordar ver la correcta polaridad durante la transferencia, por lo que el (+) marcado en la tira deberá estar posicionada al final del tren marcado con (+).
Quitar el aceite lavando la superficie externa del gel, removiendo la proteína no absorbida y resultando en una reducida línea horizontal. Colocar las tiras con el lado del gel hacia arriba en una pieza de papel filtro seco. Humedecer una segunda pieza de papel filtro y colocar suavemente en las tiras. Cuidadosamente dar golpecitos al papel sobre las tiras para quitar el exceso de aceite. Finalmente retirar el papel filtro superior, empezando desde final.
11. Cubrir cada tira IPG con 2 – 3 ml de aceite mineral fresco, después de haber colocado las tiras en el tren, verificar que no queden burbujas bajo las tiras. Colocar la tapa en el tren de enfoque.
12. Colocar el tren de enfoque en el PROTEAN EIE cell y cerrar la cubierta. Enseguida programarlo usando el protocolo apropiado. Para todas las longitudes de tira, usar la temperatura celular predefinida de 20° C, con

una corriente máxima de 50 $\mu\text{A}/\text{strip}$. Comenzar electroforesis (Ready Strip Instruction Manual BIO-RAD).

Método 2: Rehidratación activa

La carga activa puede mejorar la entrada de proteínas de alto peso molecular en el IPG. La carga activa requiere el uso del tren de enfoque EIE.

1. Preparar muestra en amortiguador de rehidratación de muestra.
2. Se utiliza el mismo volumen de rehidratación que en el punto 2 del método 1, así como las demás medidas.
3. Colocar las tiras IPG con el lado de gel hacia abajo en el tren de enfoque EIE tal que, el extremo ácido (marcado con +) va en dirección al anodo (rojo/+) del EIE cell. Asegurarse de que el gel hace contacto con los electrodos. Tener cuidado de no llevar la muestra hacia el apoyo plástico de las tiras, esta porción de la muestra no será absorbida por el material de gel. Tener cuidado de no dejar burbujas bajo la tira, en caso de que haya burbujas, con unas pinzas se puede levantar la tira ligeramente del lado del plástico y del final de la tira se sacarán las burbujas que están debajo de la tira. Cubrir con aceite mineral.
4. Rehidratar bajo condiciones activas. Programar el PROTEAN EIE cell usando las siguientes condiciones: 50 V, 20° C, 12 – 16 hrs.
5. Después de que la rehidratación este completa, saturar dos esponjas con agua, retirar exceso de agua en el papel filtro. Las esponjas deberán estar húmedos, pero no empapados.
6. Cuidadosamente levantar los extremos de cada tira con pinzas e insertar una esponja húmeda entre la tira y los electrodos.
7. Colocar el tren de enfoque en el PROTEAN EIE cell y cerrar la cubierta. Enseguida programarlo usando el protocolo apropiado. Para todas las longitudes de tira, usar la temperatura celular predefinida de 20° C, con una corriente máxima de 50 $\mu\text{A}/\text{strip}$. Comenzar electroforesis (Ready Strip Instruction Manual BIO-RAD).

Cuadro 2.

En resumen, la secuencia experimental para la electroforesis en 2D es:

- Preparación de la muestra
- Rehidratación de tira de Gradientes de pH inmovilizados (GPI)
- Enfoque isoeléctrico (EIE)
- Equilibrio de la tira GPI
- Gel de poliacrilamida-SDS
- Visualización
- Análisis

Preparación y rehidratación de la tira de gradiente de punto isoeléctrico:

A la muestra se le agrega solución de rehidratación la cual contiene Urea 9M, Ditiotreitól (DTT) 70 mM, CHAPS 2% se puede dejar durante varios días y en refrigeración, al momento de uso se le adiciona 2 μ l de amfolitos y 0.5 μ l de azul de bromofenol. La muestra se puso en un tren de rehidratación (Figura 6), seguido por la colocación de la tira sobre el gel para que se impregne con la muestra y sea absorbida por esta, este procedimiento se deja durante toda la noche.

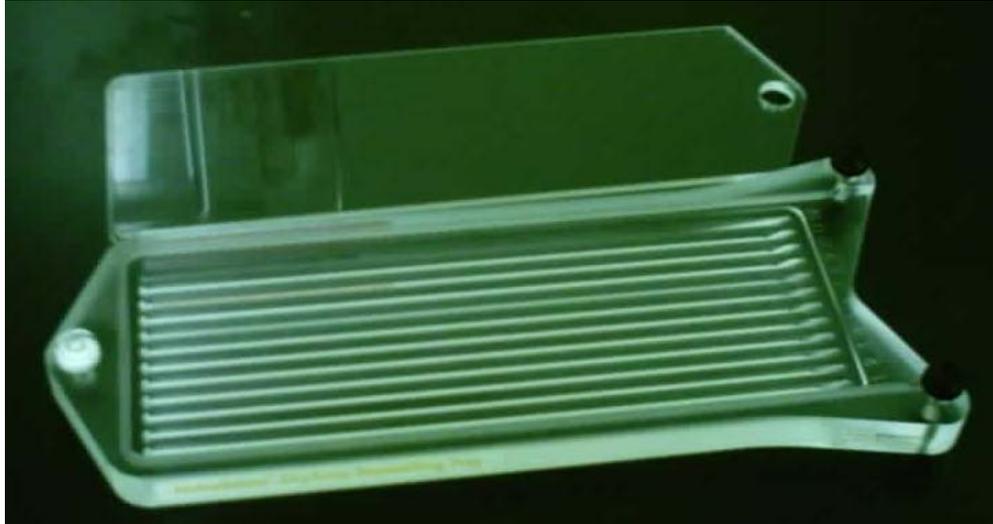


Figura 6. Tren de hidratación de tiras de gradiente de punto isoeléctrico.

Enfoque isoeléctrico:

La tira se puso en el aparato de electroforesis^a conectado a un sistema de enfriamiento a 17° C procurando dejar la parte del gel hacia arriba y cubriendo la plancha con aceite mineral (Figura 7), la primera dimensión se corrió^b con voltaje y tiempos como se refiere a continuación:

500 V/hr	1 hora
1000 V/hr	30 min
1500 V/hr	30 min
2000 V/hr	30 min*

^aBIO RAD, Multiphor II

^bPharmacia Biotech, Electrophoresis Power Supply

Se tiene que llegar a un total acumulado de 52 000 V por lo que enseguida se aumenta el voltaje a 2 500 V y el tiempo es de aproximadamente 20 h a este voltaje, aunque se puede dejar durante más tiempo siempre y cuando sume al menos los 52 000 V.

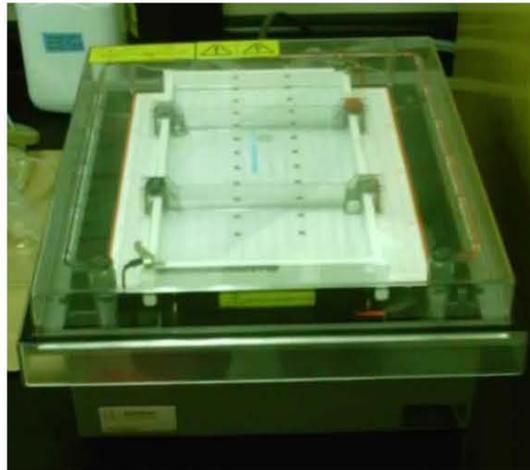


Figura 7. Corrimiento de la primera dimensión, se aprecia al centro de la plataforma en posición vertical y de color azul la tira de gradiente de punto isoeléctrico.

Mientras se corrió la primera dimensión se preparo un gel de poliacrilamida al 12%, con cristales de 16 x 18 cm, el cual se utilizo para la segunda dimensión, se dejo a temperatura ambiente y se cubre con aceite mineral en la parte superior para evitar que se deshidrate el gel hasta que sea utilizado.

Este gel se preparo 16 horas antes de su uso, las cantidades de reactivos se pueden observar en el apéndice de soluciones, entonces se continua con el corrimiento de la segunda dimensión como se observa en la Figura 8.

Equilibrio de la tira de gradiente de punto isoeléctrico con la muestra:

Al terminar la primera dimensión, se limpio el exceso de aceite de la tira de gradiente de punto isoeléctrico con dH_2O , después se pone en un tubo de ensaye el cual contiene: solución de equilibrio, DTT 1M y SDS al 10%, y se dejo en agitación^a durante 15 minutos. Al término de los 15 minutos, en otro tubo de ensaye conteniendo solución de equilibrio (ver apéndice), iodoacetamida 1M y SDS al 10% se puso la tira y se dejo en agitación^a durante 15 minutos más. Al finalizar, se dejo la tira de gradiente de punto isoeléctrico en papel filtro ligeramente húmedo para retirar el exceso de la solución de equilibrio teniendo cuidado de no lastimarla.



Figura 8. Se observa el corrimiento de la segunda dimensión, la línea azul nos indica la migración de las proteínas a través del gel.

^a Dual Action Shaker, Mod. 3508

Visualización:

Se hizo por medio de la fijación y el revelado del gel de poliacrilamida-SDS, al término de la electroforesis el gel se sometió a fijación con 50% de metanol, 50% de ácido acético y de formaldehído 37% durante no menos de 1 hora. Posteriormente, se dieron 3 lavados con 50% de etanol y 50% de dH₂O durante 20 minutos cada uno y enseguida se dio un pretratamiento con tiosulfato de sodio penta hidratado durante 1 minuto, se enjuago el gel con dH₂O 2 veces durante 20 segundos y se paso a la impregnación con nitrato de plata y formaldehído durante 20 minutos y se agitó^a, al terminar se enjuago nuevamente con dH₂O 2 veces durante 20 segundos. El revelado se realizo con carbonato de sodio, formaldehído al 37% y tiosulfato de sodio penta hidratado al 4% hasta que fueron visibles las proteínas en el gel. Posteriormente, se dieron dos enjuagues con dH₂O durante 2 minutos cada uno y por último se puso en solución de paro con ácido acético al 1 % (Görg, 2003) .

^a Dual Action Shaker, Mod. 3508

RESULTADOS

Cultivo de la bacteria

Se realizó el cultivo de *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjoprajitno, en frascos con 50 ml de medio EMJH entre 8 y 12 días, para realizar extracción de proteínas de membrana externa (PME), obteniendo desarrollo con cuentas aproximadas de 2×10^8 leptospiras por ml.

Cuantificación de proteínas de membrana externa

Una placa en la que se realizó la cuantificación de las proteínas de membrana externa de *L.* serovariedad Hardjo (Figura 9) de aproximadamente 60 kDa, se aprecia de forma clara la diferencia que existe en los pozos de las filas de la curva de albúmina, en la que se va dando una concentración de menor a mayor y aumenta la coloración de los pozos. En la cuantificación de proteína de la membrana externa se obtuvo hasta concentraciones de .68 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ como se observa en el carril de proteína 2, en el carril de proteína 1 se colocó muestra de proteínas totales y se observa la diferencia existente entre ambas muestras.

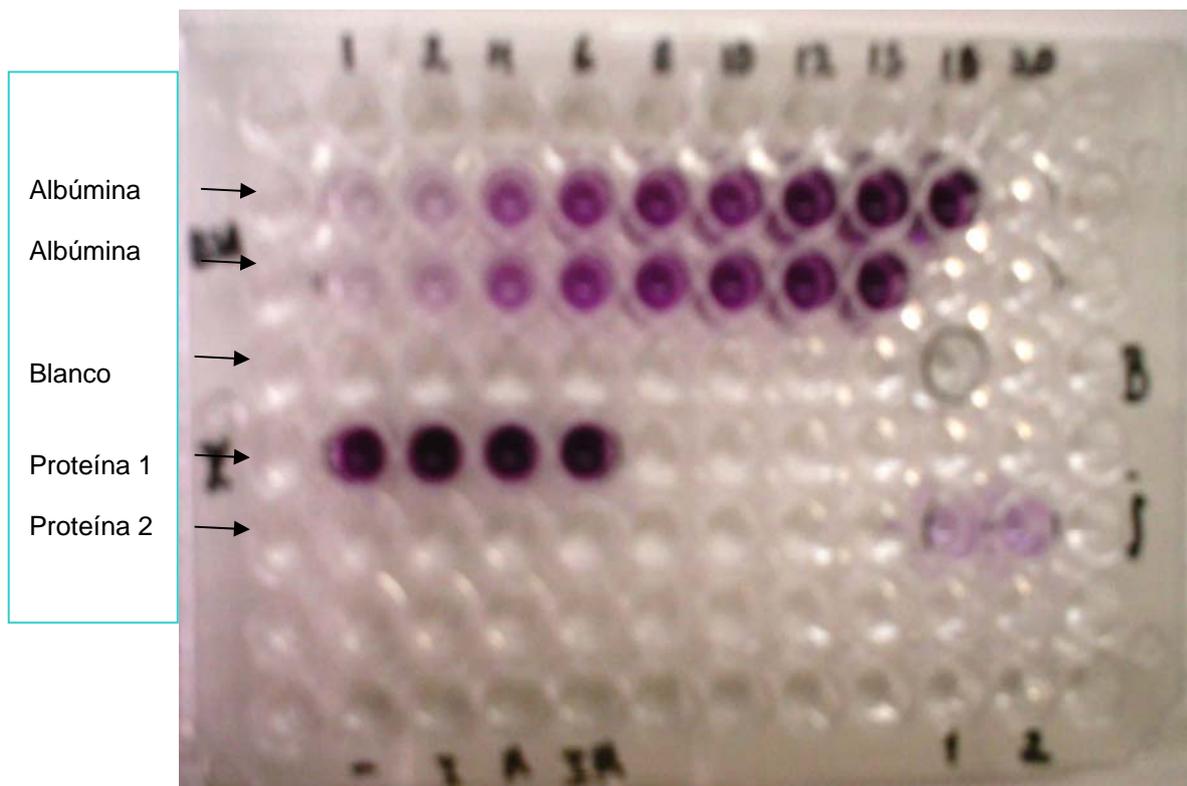


Figura 9. Placa en la que se llevó a cabo la cuantificación de la proteína de membrana externa cercana a los 60 kDa de *L. interrogans* serovariedad Hardjo.

Separación electroforética de PME en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS e inmunodetección tipo Western.

Al hacer el corrimiento de los geles conteniendo proteínas totales de *Leptospira* serovariedad Hardjo, se observaban proteínas alrededor de los 60 kDa, incluyendo una muy marcada, como se observa en la Figura 10, en este ensayo se incluyó un carril con proteínas totales de *E. coli*, para observar un poco la variabilidad que puede existir entre estas dos bacterias.

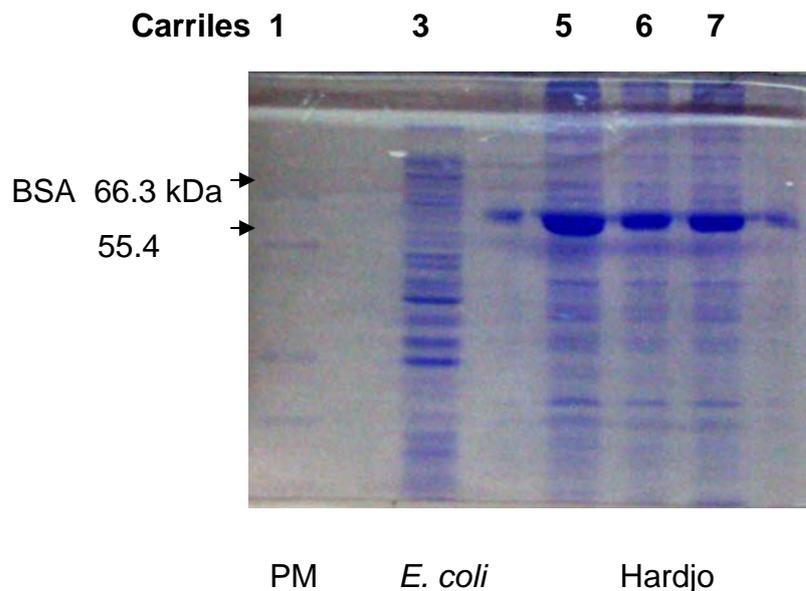


Figura 10. Gel de poliacrilamida-SDS teñido con Coomassie, donde se separaron proteínas totales *Leptospira* serovariedad Hardjo y *E. coli*. (Carril 1) marcador de peso molecular (PM); (Carril 3) *E. coli*; (Carriles 5,6 y 7) *Leptospira* serovariedad Hardjo. Como referencia el marcador de peso molecular es marcado con flechas en los pesos cercanos a los 60 kDa, la albúmina sérica bovina es una de las líneas marcadas la cual tiene un peso de 66.3 kDa.

Durante los primeros ensayos de inmunotransferencia no se obtuvieron resultados satisfactorios, en la Figura 11, se observa un ensayo que se llevo a cabo con proteínas de la membrana externa obtenidas de la extracción con tritón X-114 de la serovariedad Hardjo utilizando suero positivo a *L.* serovariedad Hardjo con títulos de 1:800 a una dilución de 1:200, en este caso no se observo ninguna banda que pudiera darnos un dato positivo.

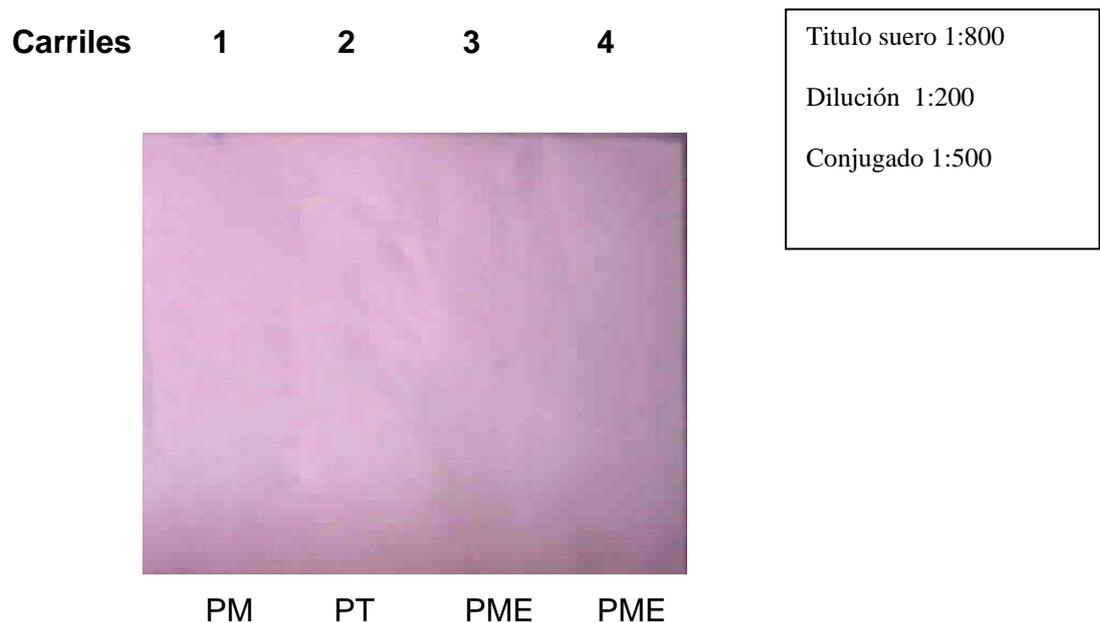


Figura 11. Transferencia de gel de poliacrilamida-SDS con PM (carril 1); muestra de proteínas totales (carril 2); PME de la extracción con Tritón X-114 (Carriles 3 y 4 respectivamente) a membrana de nitrocelulosa.

Para los siguientes ensayos (Figura 12), se realizaron con proteínas totales de *E. coli* y Hardjo para observar si había un cambio significativo en el resultado, aquí se hizo un cambio en la dilución del suero positivo a *Leptospira* serovariedad Hardjo, se utilizó una dilución de 1:100 y se pueden observar varias bandas en ambas muestras.

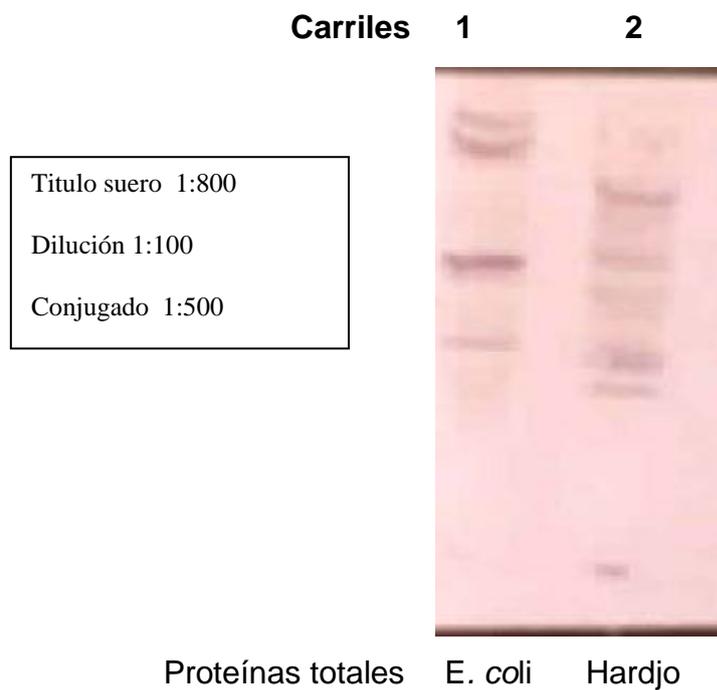


Figura 12. Gel de poliacrilamida-SDS con proteínas totales de *E. coli* y *L. serovariedad Hardjo* (Carriles 1 y 2 respectivamente) transferido a membrana de nitrocelulosa.

En el resultado de un gel de poliacrilamida-SDS (Figura 13), se obtuvieron bandas en el carril de PME; este mismo resultado se refleja en la membrana al termino de la transferencia (Figura 14), durante varios ensayos de extracción de PME se tuvieron muchos problemas ya que no se veían bandas, esto cambio a partir de que se modificaron algunas constantes de centrifugación aumentando las revoluciones por minuto en algunos de los pasos del protocolo, los primeros resultados a partir de estas modificaciones se aprecian en las Figuras 15 y 16.

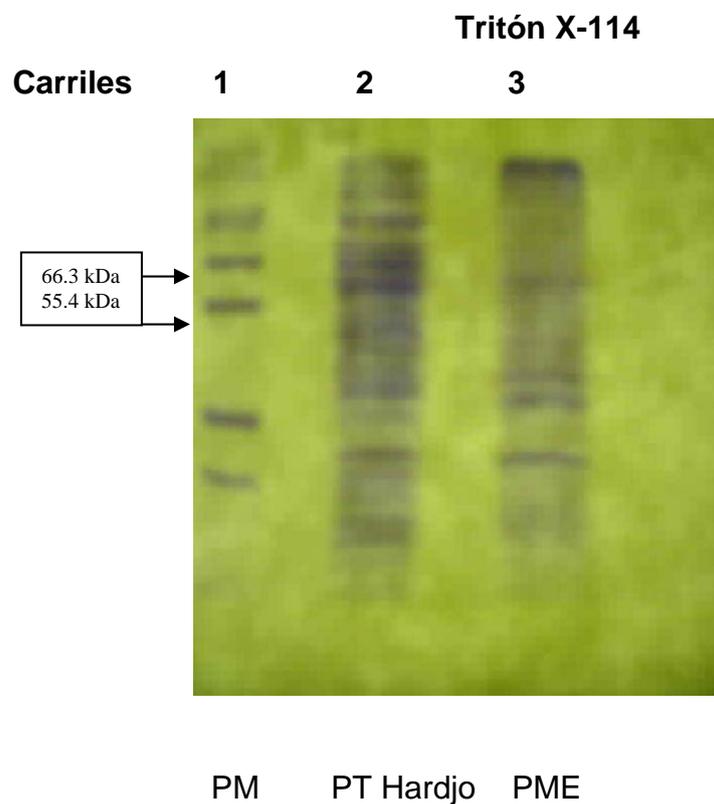


Figura 13. Gel de poliacrilamida-SDS, teñido con Coomassie, PM (Carril 1); proteínas totales de la serovariedad Hardjo (Carril 2); PME (Carril 3).

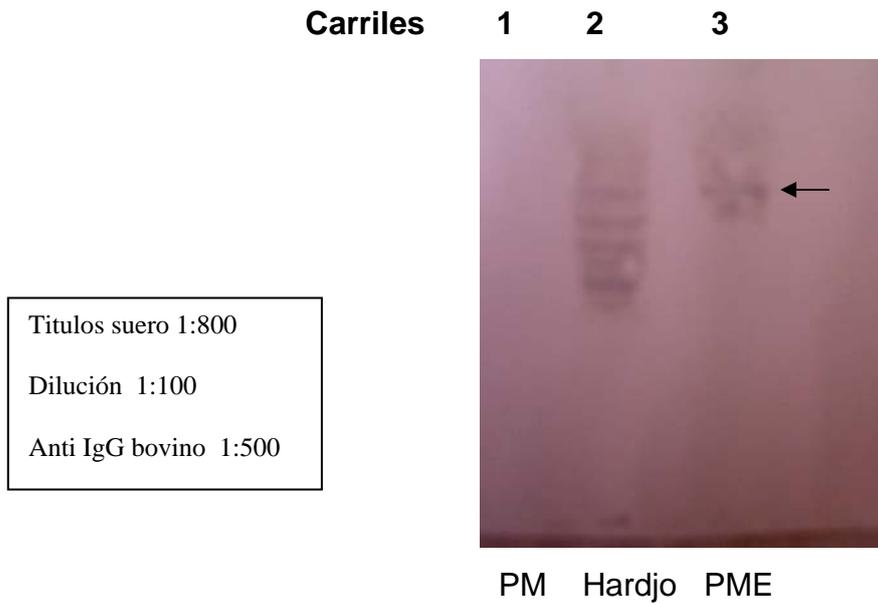
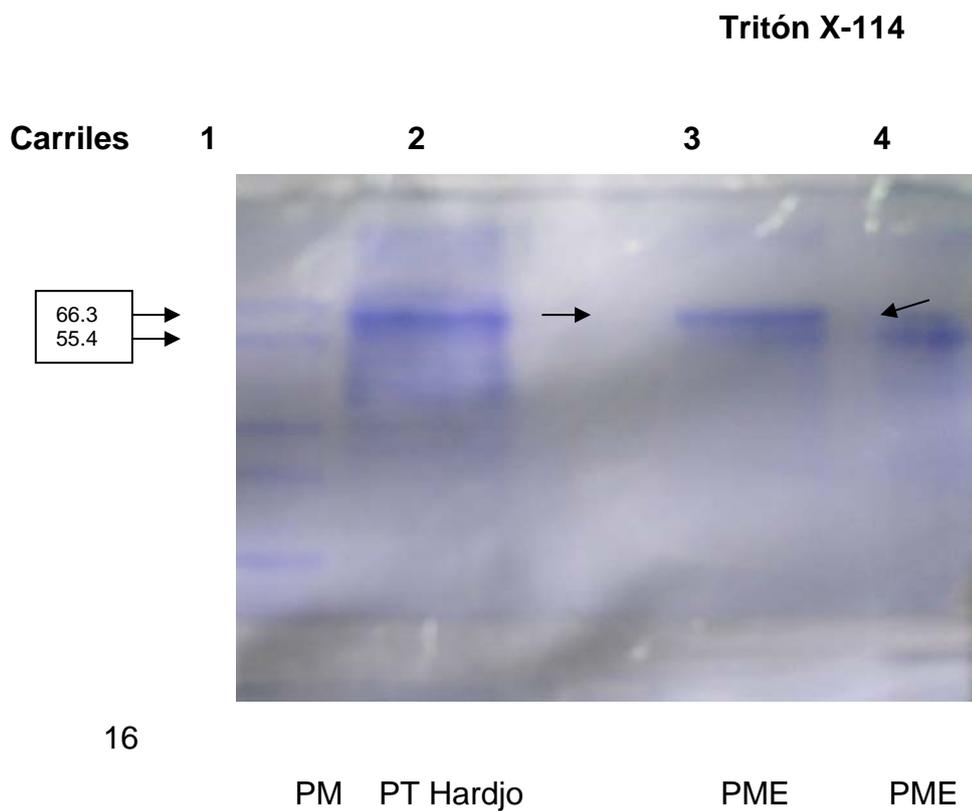
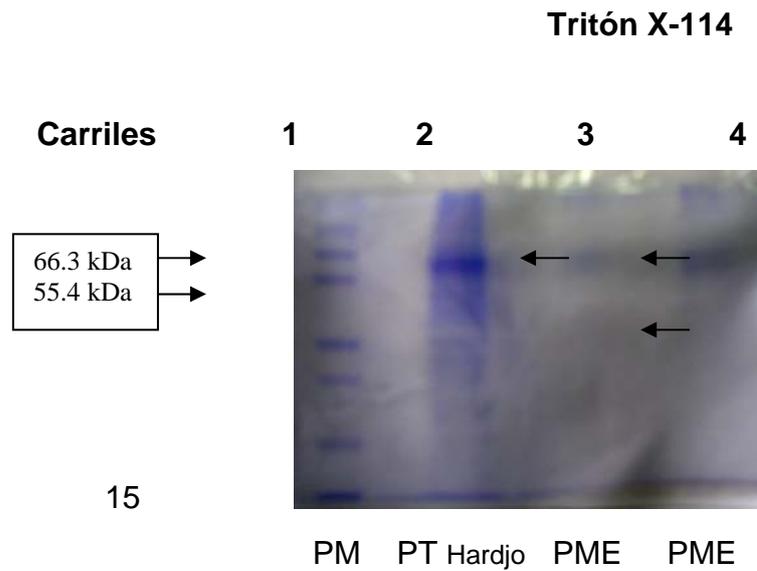


Figura 14. Transferencia a membrana de nitrocelulosa, PM (Carril 2) y PME en el (Carril 3) con la flecha se señala una banda en el carril 3.

Resultados como el de las Figuras 15 y 16, donde se hizo el corrimiento de proteínas de la membrana externa con tritón X-114 fueron poco visibles, solo se observaban algunas bandas de alrededor de los 60 kDa, pero no se podían ver algunas otras, lo que hacia creer que el material era insuficiente, que algo no se estaba haciendo correctamente o que el procedimiento no era el optimo, por lo que se decidió utilizar un método alterno.



Figuras 15 y 16. Geles de poliacrilamida-SDS con PM (Carril 1); proteínas totales d *L. serovariedad* Hardjo (Carril 2); PME de la extracción con Tritón X-114 en los (Carriles 3 y 4) respectivamente.

Dado que la claridad de la extracción de PME por tritón X-114 al 10% no era suficiente, se buscó un protocolo alternativo de extracción de PME que se hubiera usado en otros estudios, entonces se utilizó un método con tritón X-100 al 1% y lisozima, a comparación del protocolo con tritón X-114 este método se lleva a cabo todo en frío y no con incubaciones a 37°C. Además se continuaron haciendo ensayos con tritón X-114; se corrieron geles de poliacrilamida-SDS (Figuras 17 y 18), así como transferencias de ambos métodos (Figura 20) para hacer la comparación, se pueden apreciar bandas tanto de PME por tritón X-114, así como en los carriles correspondientes a la extracción con tritón X-100 y lisozima. De acuerdo a los resultados obtenidos se eligió continuar con las extracciones con tritón X-114, con el que se obtuvo un mejor resultado.

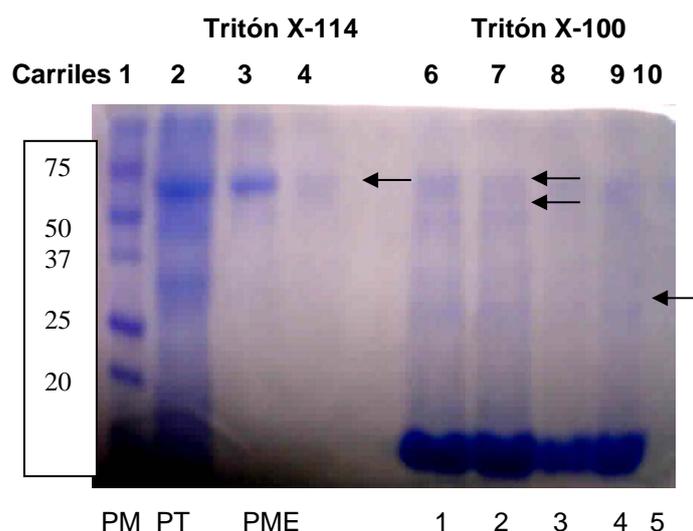


Figura 17. Gel de poliacrilamida-SDS, (Carril 1) PM; PT (Carril 2); PME de la extracción con Tritón X-114 (Carriles 3 y 4) respectivamente; en los demás carriles se muestran los restos que van quedando durante el proceso de la extracción con Tritón X-100 y corresponden a (Carril 6) 1, sobrenadante después de centrifugar el pellet de cultivo con buffer de lisis; (Carril 7) 2, pellet resuspendido nuevamente en buffer de lisis; (Carril 8) 3, material que llega hasta el final con precipitación de acetona; (Carril 9) 4, restos de tritón X-100 que quedan durante el proceso y (Carril 10) 5, pellet restante cuando se separa el sobrenadante para ser precipitado en acetona.

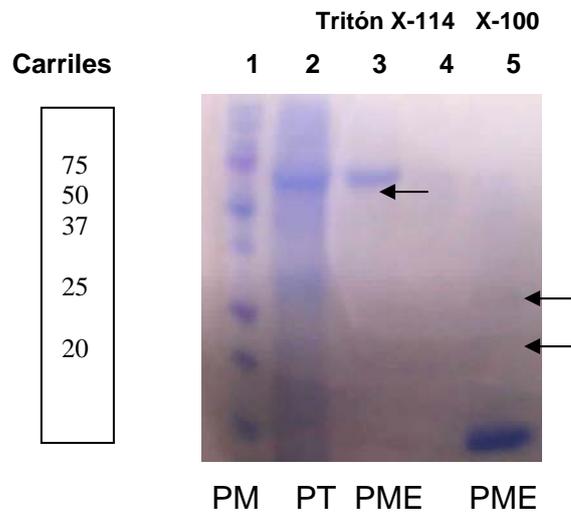


Figura 18 se tomaron las mismas muestras de extracción con Tritón X-114 y el equivalente del (Carril 8) 3, en la extracción con Tritón X-100.

Entre los ensayos hechos con tritón X-114 y tritón X-100 no había diferencias significativas, pero con modificaciones propias en el protocolo de extracción de proteínas de la membrana externa con tritón X-114, se obtuvieron los resultados vistos en las Figuras 19 a y b, donde se ven un número mayor de bandas incluyendo las vistas en el peso de alrededor de los 60 kDa, lo que llevo a tomar la decisión de continuar con este protocolo, en la Figura 20 se aprecia un ensayo en condiciones similares.

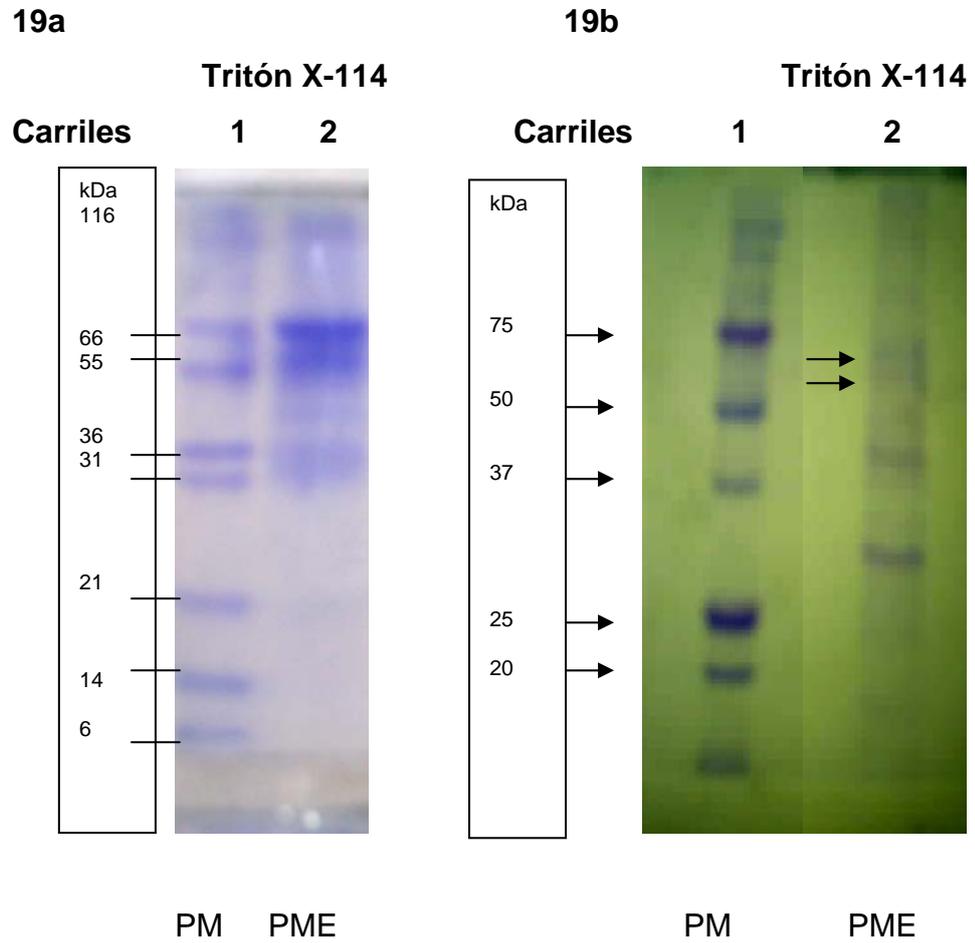
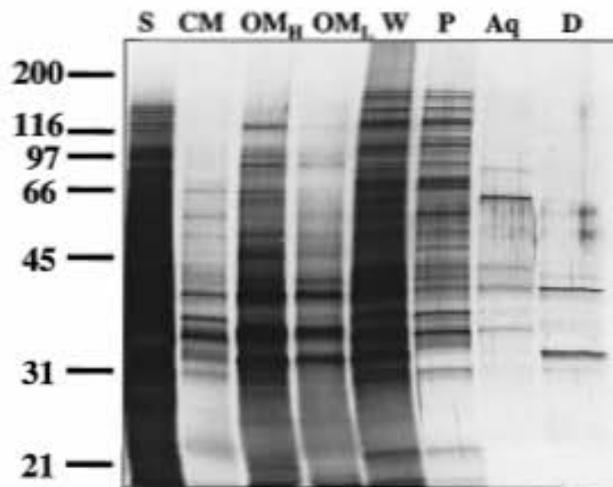


Figura 19. Extracción de PME con Tritón X-114, Figura 19^a las PME gel de poliacrilamida se presenta en la Figura 19b, el marcador de peso molecular (PM) se observa al lado izquierdo de cada gel.



Fuente: Cullen *et al.*, 2003

Figura 20. Ensayo similar realizado con *L. kirschneri* para visualizar PME con tinción de plata, en el (Carril P) se tienen proteínas totales y en el (Carril D) proteínas de la membrana externa.

Para los siguientes ensayos se hizo el corrimiento del gel de poliacrilamida-SDS, así como la transferencia de ambos métodos de extracción y los resultados fueron claros en los dos casos, en la Figura 21 se aprecia la transferencia de las PME, los 5 carriles por el método de tritón X-100 son también observados con bandas presentes en todos los carriles, cabe mencionar la similitud entre las bandas observadas de la extracción por tritón X-114 y el carril número 2 de la extracción con el tritón X-100, un cambio en la transferencia fue la dilución del suero, la cual se cambió a 1:50.

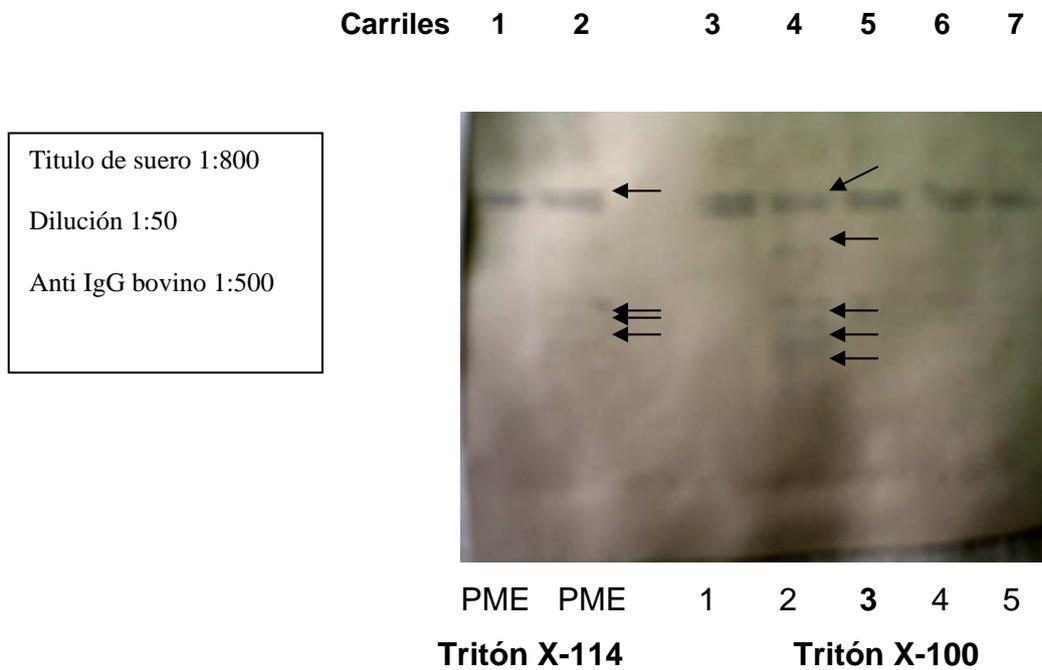


Figura 21. Transferencia en membrana de nitrocelulosa, (Carriles 1 y 2) PME de la extracción con Tritón X-114; (Carriles 3 – 7) extracción con X-100. Las flechas señalan las proteínas visibles en las PME con Tritón X-114 y las observadas en la muestra 3 de la extracción con X-100.

En el ensayo observado en la Figura 22, se manejaron las mismas condiciones para el gel de poliacrilamida-SDS y la transferencia a membrana de nitrocelulosa, en este caso se agregó un carril con proteínas totales, así como un marcador de peso molecular preteñido, el resultado fue muy similar al anterior, entonces un cambio que sirvió para la observación de estas bandas ha sido sin duda el cambio de dilución del suero a 1:50 con la que los resultados fueron los mejores, los resultados observados en las PME con tritón X-114 son congruentes con la revisión de artículos, en particular con Cullen *et al.*, 2003 (Figura 23).

Titulo suero 1:800
Dilución 1:50
Anti IgG bovino 1:500

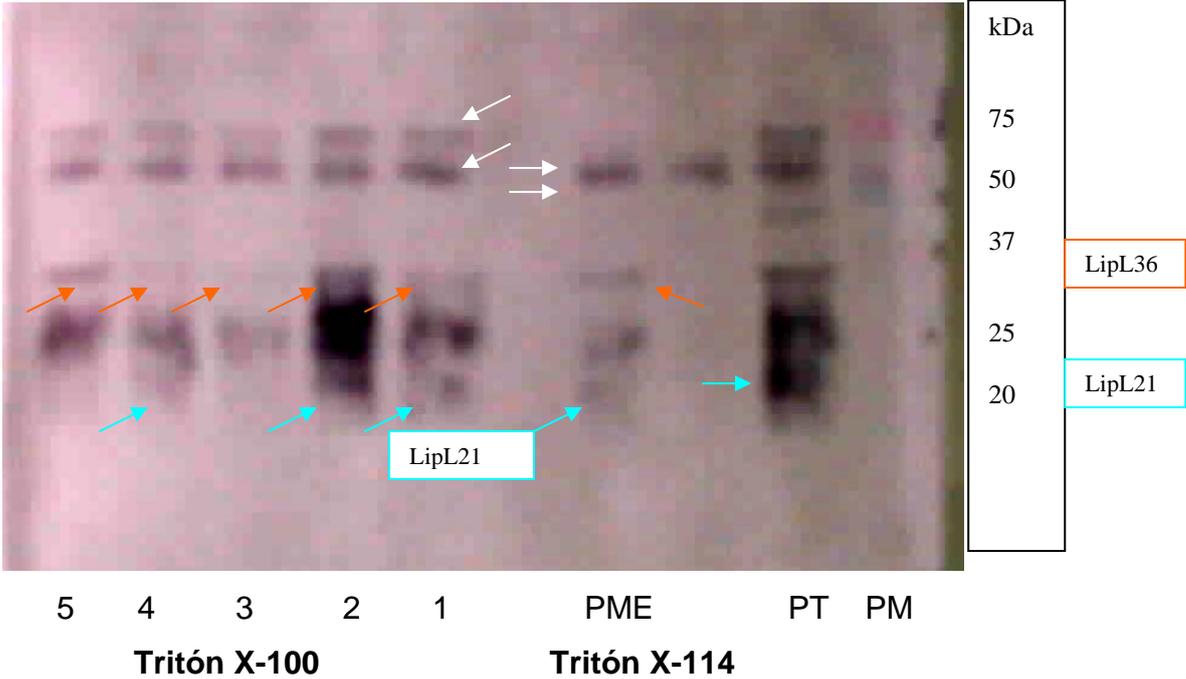
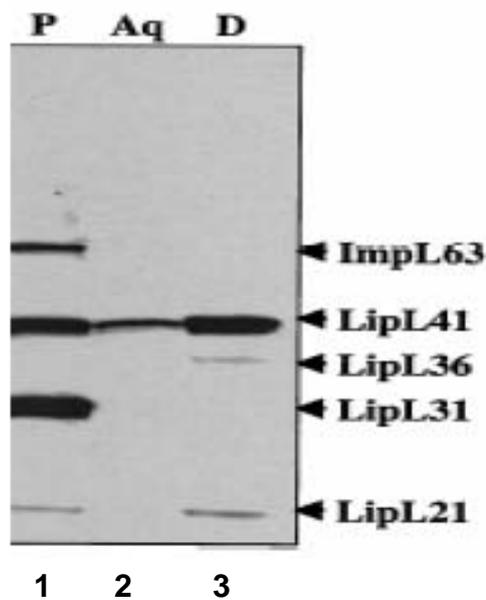


Figura 22. Transferencia en membrana de nitrocelulosa, (Carriles 1 – 5) extracción de PME con Tritón X-100; (Carriles 7 y 8) PME respectivamente de la extracción con Tritón X-114; (Carril 9) proteínas totales de *Leptospira* serovariedad Hardjo y (Carril 10) marcador de peso molecular. Las flechas en color verde agua muestran a la lipoproteína LipL21, las flechas en color naranja señalan a la lipoproteína LipL36 y las flechas en blanco a las proteínas cercanas a los 60 kDa.



Fuente: Cullen *et al.*, 2003

Figura 23. Transferencia realizada por Cullen *et al.*, 2003 (Carril 1) proteínas totales; (Carriles 2 y 3) PME de la extracción con Tritón X-114 en *L. kirschneri*.

Se realizó la transferencia en membrana de nitrocelulosa con la proteína eluida y posteriormente concentrada de aproximadamente 60 kDa (Figura 24), en este ensayo se utilizó un suero positivo a *Leptospira* perteneciente a los animales que reportó Banda *et al.*, 1996 con títulos de 1:800, también se usó la misma dilución del suero de 1:50 y como se puede observar esta proteína es reactiva al suero.

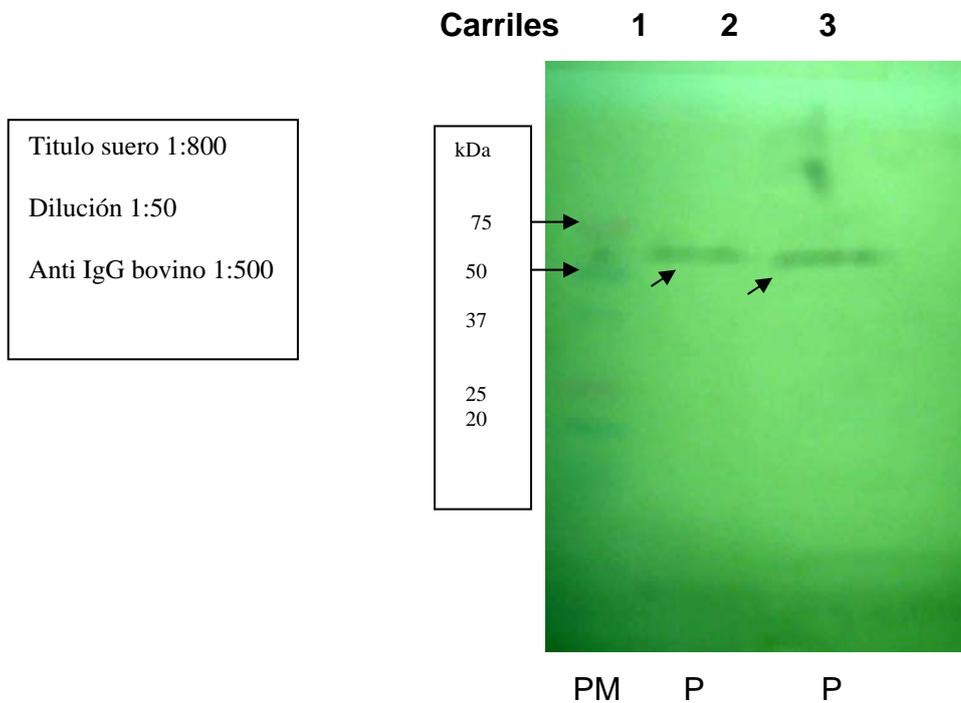


Figura 24. Transferencia en membrana de nitrocelulosa, (Carril 1) marcador de peso molecular; (Carriles 2 y 3) proteína concentrada (P). En el carril 1, las flechas señalan los pesos de 75 y 50 kDa, las flechas en los carriles 2 y 3 muestran la proteína concentrada de aproximadamente 60 kDa.

Se realizó una transferencia de la proteína concentrada a membrana de nitrocelulosa utilizando anti GroEL (Figura 25), para descartar que dicha proteína se tratara de esta proteína de choque térmico, obteniendo un resultado negativo.



Figura 25. Transferencia en membrana de nitrocelulosa utilizando anti GroEL a una dilución de 1:20000, (Carril 1) marcador de peso molecular, (Carril 2) proteína concentrada.

Separación de las PME en dos dimensiones

En el ensayo de doble dimensión (Figura 26) varias proteínas y lipoproteínas señaladas con flechas se observaron, en una comparación con los resultados obtenidos por Cullen *et al.*, 2002 y Guerreiro *et al.*, 2001 observados en las Figuras 27 y 28 respectivamente, varias de las proteínas y lipoproteínas no se observan, aunque todas las proteínas vistas en este ensayo coinciden.

La concentración que se utilizó de proteínas de membrana externa fue de 5.07 $\mu\text{g}/150 \mu\text{l}$ que fue la cantidad que se agregó a la tira de gradiente de punto isoeléctrico que se utilizó.

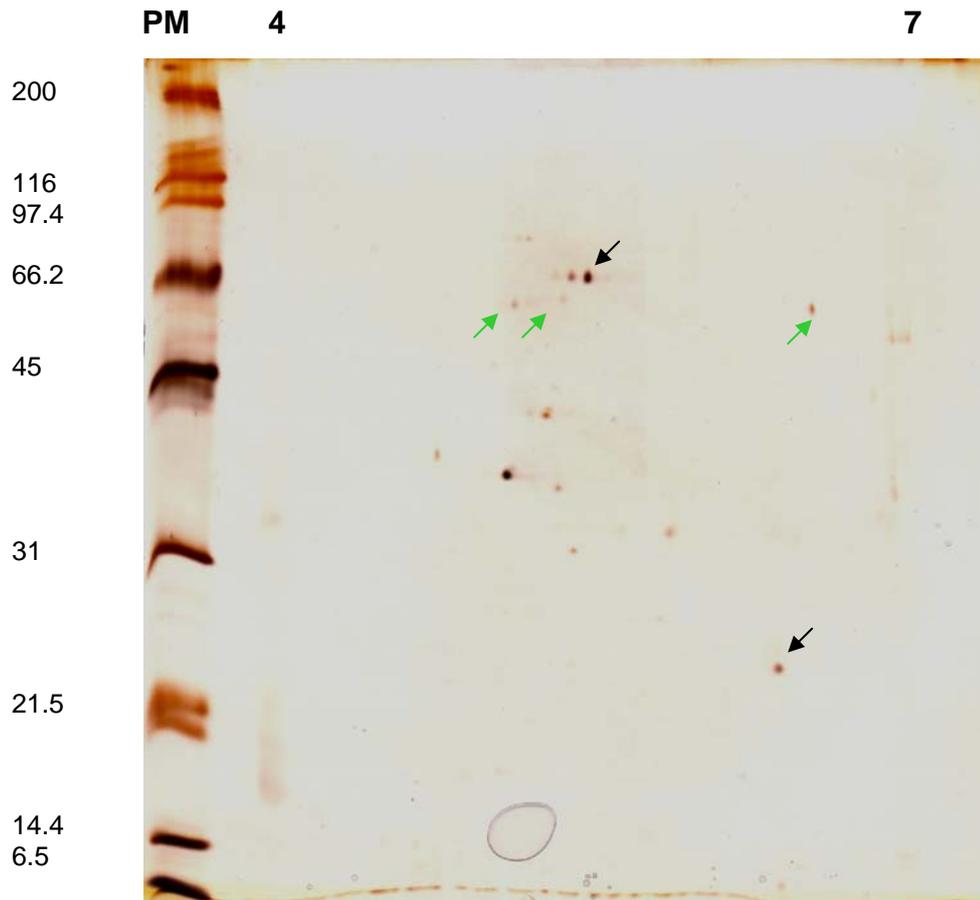
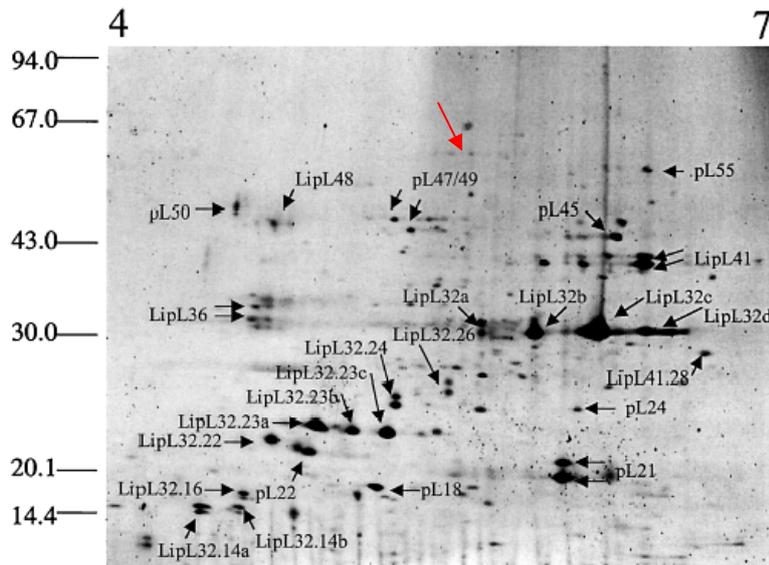
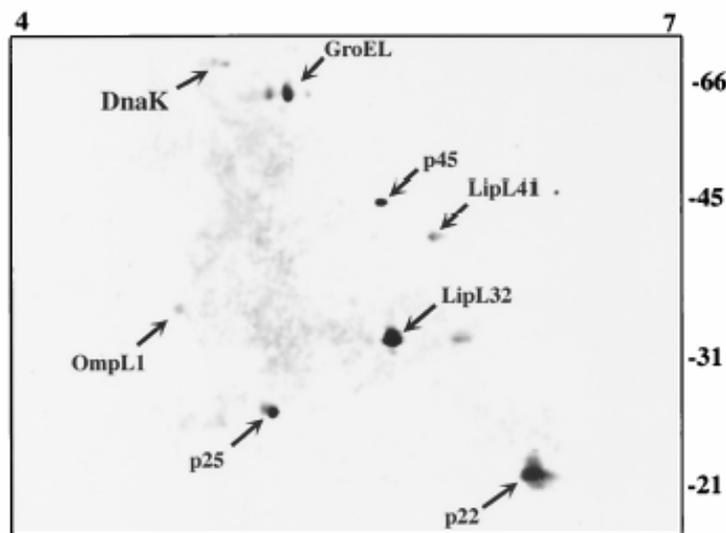


Figura 26. Gel de doble dimensión de proteínas de membrana externa en *Leptospira* serovariedad Hardjo, marcador de peso molecular (PM), se utilizó tira de gradiente de punto isoeléctrico de 4 a 7. Las flechas que han sido identificadas con un peso cercano a los 60 kDa son marcadas con flechas en color verde.



Fuente: Cullen *et al.*, 2002

Figura 27. Gel de doble dimensión de proteínas de membrana externa de *Leptospira interrogans* serovariedad Lai, utilizando un gradiente de punto isoeléctrico de 4 a 7. Las proteínas identificadas son marcadas con flechas, con una flecha roja se indican tres proteínas parecidas a lo encontrado en nuestro ensayo en doble dimensión.



Fuente: Guerreiro *et al.*, 2001

Figura 28. Ensayo en doble dimensión indicando la localización de lipoproteínas conocidas y 3 no conocidas, en el caso de p45, p25 y p22. En este ensayo se aprecia GroEL, la cual es similar a las tres manchas observadas en nuestro ensayo.

DISCUSIÓN

En este trabajo, la serovariedad Hardjo de *Leptospira* se desarrolló en medio de cultivo EMJH entre 8 y 12 días en promedio, hasta alcanzar una cuenta con la cámara de Petroff Hausser de 2×10^8 leptospiras por ml.

El método de extracción de proteínas de membrana externa por (Cullen *et al.*, 2003) resultó efectivo, se lograron concentraciones de proteínas de membrana externa de hasta 0.28 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para llevar a cabo los ensayos posteriores.

En el presente trabajo se reporta la identificación de una proteína de 60 kDa en la membrana externa de *Leptospira* a partir de cultivos de la serovariedad Hardjo.

En trabajos previos se ha podido corroborar sobre la importancia del estudio de las proteínas de la membrana externa de *Leptospira*, como lo mencionado por (Haake *et al.*, 2005). Antígenos del LPS varían grandemente entre serovariedades de *Leptospira*, en contraste al LPS las proteínas de membrana externa de *Leptospira* son altamente conservadas entre serovariedades patógenas. Por esta razón, es de gran interés el estudio de las proteínas de membrana externa de *Leptospira* para el desarrollo de pruebas serodiagnósticas precisas, así como vacunas de amplio espectro efectivas para la protección de individuos en riesgo.

En numerables resultados obtenidos por otros autores para la obtención de proteínas de membrana externa, el utilizar tritón X-114 como comentan Haake *et al.* (2005), es de uso común para laboratorios que estudian las proteínas de la membrana externa de *Leptospira*. El método más fácil de utilizar para aislar la membrana externa son los detergentes no iónicos Tritón X-100 o Tritón X-114, ya que cuentan con la ventaja de permitir la separación de proteínas de membrana externa de las proteínas periplásmicas contaminantes. Los resultados obtenidos en la visualización después de la electroforesis por gel de poliacrilamida-SDS, mostraron similitud a ensayos observados en otros trabajos, en los que se utilizan la serovariedad Hardjo entre otras.

Para la observación de estos resultados, como proteínas que reaccionan a sueros de animales convalecientes a *Leptospira* se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa, se utilizó anti IgG de bovino como anticuerpo secundario y se obtuvieron resultados favorables, ya que proteínas que no fueron visibles al momento de teñir el gel de poliacrilamida-SDS fueron observadas en la membrana. Natarajaseenivasan *et al.* (2004) mencionan en su trabajo que los antígenos contra la respuesta predominante observada fueron contra anticuerpos de IgG en comparación a los anticuerpos de IgM, estos últimos fueron detectados mayormente en proteínas de *Leptospira* de 14 a 45 kDa, en lo que respecta a IgG, la respuesta fue en proteínas en el rango de 31 a 82 kDa.

En lo correspondiente a esta detección de proteínas por inmunotransferencia (Figura 22), se pudieron detectar en forma similar proteínas como LipL36 y LipL21 a lo encontrado por (Guerreiro *et al.*, 2001 y Nally *et al.*, 2001), donde se pueden apreciar estas mismas proteínas, así como otras más como LipL32 o LipL41, pero se observan además unas bandas cercanas a los 60 kDa. Cullen *et al.* (2003) a su vez realizó la transferencia del gel de poliacrilamida-SDS de fracciones con Tritón X-114 y utilizó antisueros

anti ImpL63, LipL41, LipL36, LipL31 y LipL21 obteniendo el resultado observado en la Figura 23.

Al realizar la inmunotransferencia en una dimensión se han observado 2 bandas cercanas a los 60 kDa, las cuales han sido las de interés para este trabajo, una cercana a los 66 kDa y otra de aproximadamente 62 kDa, a la cual se le dio seguimiento, dado que la primera proteína coincide con lo observado en otros trabajos donde se hace referencia a que es GroEL, una proteína de choque térmico y para evitar cualquier confusión con esta proteína en el ensayo hecho en este trabajo usando anti GroEL, se obtuvo un resultado negativo en la proteína a la que se le había dado seguimiento.

Cullen *et al.* (2005) describe a GroEL, como una proteína chaperona de poco menos de 66 kDa que participa en numerosas interacciones proteína – proteína; un bajo nivel de identificación de esta proteína en la superficie celular es probablemente entendido, pero es quizá el resultado de la liberación de esta proteína desde el lisado celular antes de vincularse a la superficie de células intactas. En trabajos realizados por (Matsunaga *et al.*, 2003, Natarajaseenivasan *et al.*, 2004) también se hace referencia sobre esta proteína de choque térmico.

Lipoproteínas de la membrana externa han sido caracterizadas, incluyendo LipL21, LipL32, LipL36, LipL41, LipL48 y la porina OmpL1, así como las proteínas de choque térmico DnaK y GroEL, designadas de acuerdo a su aparente masa molecular determinada por electroforesis en gel SDS-poliacrilamida (Haake *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2005 y Matsunaga *et al.*, 2002).

En la separación de proteínas en doble dimensión se pudieron observar dos proteínas cercanas a los 60 kDa que de acuerdo al marcador de peso molecular coincide con lo observado en una dimensión, las cuales están señaladas en la Figura 26, en ensayos como los de (Cullen *et al.*, 2002; Guerreiro *et al.*, 2001) no se aprecian con claridad estas dos mismas proteínas,

aunque por otro lado las proteínas de GroEL observadas por ellos, en este trabajo fueron observadas como se indica en las Figuras 26, 27 y 28.

LipL21 y LipL41 aparecen expuestas en la superficie. LipL32 es la mayor proteína de membrana externa leptospiral y tiene efecto inmunoprotector cuando hámsteres son inmunizados. El grado en el que LipL32 esta expuesto en la superficie no se ha determinado. LipL32, LipL41 y OmpL1 son los principales antígenos en la respuesta inmune humoral para leptospirosis (Haake *et al.*, 2004).

Para Matsunaga *et al.* (2002) estos resultados sugieren que una efectiva subunidad vacunal puede ser desarrollada usando una o más proteínas de *Leptospira*, las proteínas de la membrana externa son de gran interés, por que estas proteínas son potencialmente expuestas al sistema inmune del huésped en la superficie leptospiral. La conservación antigénica de proteínas fue demostrada por inmunodetección, la cual por suero de conejos hiperinmunizados con una cepa reconoció numerosas proteínas de una amplia variedad de serovariedades.

En estudios, la conservación antigénica de LipL41 y OmpL1 entre todas las serovariedades patógenas de *Leptospira* sugieren que estas proteínas de membrana externa podrían proveer una protección parcial contra desafíos heterologos.

Ya que la respuesta inmune adquirida para los componentes del LPS leptospiral confieren inmunidad específica a la serovariedad, el análisis de los antígenos de *Leptospira* por respuesta inmune humoral a una infección adquirida naturalmente, es una propuesta efectiva para identificar proteínas expresadas durante la infección. Anticuerpos para la infección asociada a proteínas como OmpL1, LipL41, LipL32, P31 LipL45 (Qlp42) y LigA son generados durante la infección animal o en el humano (Matsunaga *et al.*, 2003).

CONCLUSIONES

Una proteína de 60 kDa se encontró a partir de la extracción de proteínas de membrana externa en cultivos de *Leptospira* serovariedad Hardjo.

Dicha proteína fue reactiva a sueros de animales convalecientes positivos a *Leptospira*.

Se pudieron identificar dos proteínas con el mismo peso cercano a los 60 kDa en la separación de proteínas en doble dimensión.

No fue posible la identificación por secuenciación.

LITERATURA CITADA

1. Abdulkader R, Daré E, Camargo E, Spinosa C, Da Silva M. Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2002; 44:(2) 79 – 83.
2. Alves S, LeFebvre R, Probert W. Amino acid sequences of proteins from *Leptospira* serovar Pomona. Short Communication. 2000; 95(4): 503-504.
3. Arzouni J, Parola P, La Scola B, Postic D, Brouqui P, Raoult D. Human Infection Caused by *Leptospira fainei*. *Emerging Infectious Diseases*. 2002; 8:(8) 865-868.
4. Bajani M, Ashford D, Bragg S, Woods C, Aye T, Spiegel R, Plikaytis B, Perkins B, Phelan M, Levett P, Weyant R. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:(2) 803-809.
5. Banda V, Arriaga C, García L. Perfiles electroforéticos de algunas cepas de *Leptospira interrogans* de importancia en Bovinos. XX Congreso de Buiatría. 1996; 42- 44.
6. Barnett J, Barnett D, Bolin C, Summers T, Wagar E, Cheville N, Hartskeerl R, Haake D. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Inf Imm*. 1999; 67:(2) 853-861.
7. Barocchi M, Ko A, Ramos S, Galvao M, Riley L. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni and application to PCR – based differentiation of *Leptospira* serogroups. *J of Clin Microbiol*. 2001; 39:191 – 195.

8. Berkelman T, Stenstedt, T. 2 – D electrophoresis, using Immobilized pH gradients principles and methods. 1998; 3 – 33.
9. Bermejo A, Duarte J. Mecanismos de transducción del lipopolisacárido. Trabajos originales, Ars Pharmaceutica. 2003; 44:121-139.
10. Bharti A, Nally J, Ricaldi J, Matthias M, Diaz M, Lovett M, Levett P, Gilman R, Willig M, Gotuzzo E, Vinetz J. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. The Lancet Infectious Diseases. 2003; 3:757-771.
11. Bolsover S, Hyams J, Shephard E, White H, Wiedemann C. Cell Biology: Chapter 3. A Short course, second edition. 2004; 51-59.
12. Brown J, Lefebvre R, Pan M. Protein and antigen profiles of prevalent serovars of *Leptospira interrogans*. Inf Imm. 1991; 59:(5) 1772 – 1777.
13. Brown P, Carrington D, Gravekamp C, Kemp H, Edwardsd C, Jones S, Prussia P, Garriques S, Terpstra W, Levett P. Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. Research in Microbiology. 2003; 154:581–586.
14. Cullen P, Cordwell S, Bulach D, Haake D, Adler B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. Inf Imm. 2002; 70:2311 – 2318.
15. Cullen D, Haake D, Bulach D, Zuerner R, Adler B. LipL21 Is a Novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. Inf Imm. 2003; 71:2414 – 2421.
16. Cullen P, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko A, Haake D, Adler B. Surfaceome of *Leptospira* spp. Inf Imm. 2005; 8:(73) 4853 – 4863.

17. Darnell J. *Bilología Celular y Molecular*. Ediciones OMEGA; Barcelona, España. 1993; 529 – 549, 717 – 731.
18. Diament D, Colo M, Calo E, Georges E, Salomao R. Peripheral Blood Mononuclear Cell Activation Induced by *Leptospira interrogans* Glycolipoprotein. *Inf Imm*. 2002; 70(4) 1677-1683.
19. Dunbar B, Kimura H, Timmons T. Protein análisis using high-resolution two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. *Meth in Enzym*. 1990; 182: 441 – 457.
20. Effler P, Domen H, Bragg S, Aye T. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:1081 – 1084.
21. Effler P, Bogard A, Domen H, Katz A, Higa H, Sasaki D. Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:(4) 1464-1469.
22. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira y leptospirosis*, MediSci, 2^a Ed. 2000; 67 – 70.
23. Fichmann J, Westermeier R. 2 – D Proteome analysis protocols. *Methods in Molecular Biology*. 2000; 1 – 7.
24. Flannery B, Costa D, Guerreiro H, Matsunaga J. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen – based enzyme – linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:3303 – 3310.

25. Gamberini M, Gómez R, Atzingen M, Martins E, Vasconcellos S, Romero E, Leite L, Ho P, Nascimento A. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. *FEMS Microbiol Letters*. 2005; 244: 305 – 313.
26. González A, Batista N, ortiz M, Torres V, Infante J, González M. Evaluación de dos esquemas de inmunización para la producción de sueros hiperinmunes contra *Leptospira interrogans*. *VacciMonitor*. 2002; 11:(3) 6-10.
27. González A, Batista N, Valdés Y, González M. Crecimiento, virulencia y antigenicidad de *Leptospira interrogans* serovar mozdok en medio EMJH modificado. *Rev Cubana Med Trop*. 2002; 54:(1) 32-36.
28. González A, Rodríguez Y, Batista N, Valdés Y, González M. Caracterización microbiológica de cepas candidatas vacunales de *Leptospira interrogans* serogrupo Ballum. *Rev Cubana Med Trop*. 2003; 55:(3) 146 – 152.
29. Görg A. Two – Dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis. A Laboratory Manual. Technische Universität München. 2003; 6 – 45.
30. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvao M, Levett P, Ko A, Haake D. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Inf Imm*. 2001; 69:(8) 4958-4968.
31. Haake D, Walker E, Blanco D, Bolin C, Lovett M. Changes in the Surface of *Leptospira interrogans* Serovar gryppotyphosa during In Vitro Cultivation. *Infect and Imm*. 1991; 59:1131 – 1140.

32. Haake D, Summers T, McCoy A, Schwartzman W. Heat shock response and groEL sequence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana*. *Microbiology*. 1997; 143: 2807 – 2815.
33. Haake D, Martinich C, Summers T, Shang E, Pruetz J, McCoy A, Mazel M, Bolin C. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: Down regulation associated with late-log phase growth and mammalian infection. *Inf Imm*. 1998; 66:(4) 1579 – 1587.
34. Haake D, Mazel M, McCoy A, Chao G, Matsunaga J, Wagar E. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Inf Imm*. 1999; 67:6572 – 6582.
35. Haake D, Chao G, Zuerner R, Barnett J, Mazel M, Matsunaga J, Levet P. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Inf Imm*. 2000; 68:2276 – 2285.
36. Haake D, Matsunaga J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Inf Imm*. 2002; 70:(9) 4936-4945.
37. Haake D, Dundoo M, Cader R, Kubak B, Hartskeerl R, Sejvar J, Ashford D. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. *Brief Reports*. 2002; 34:40 – 43.
38. Haake D, Suchard M, Kelley M, Dundoo D, Zuerner R. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J Bacteriol*. 2004; 9:(186) 2818 – 2828.
39. Haake D, Matsunaga J. Commentary. Leptospiral membrane proteins – variations on a theme?. *Indian J Med Res*. 2005; 121:143 – 145.

40. Hasnain S, Ahmed N. Reflection and reaction, Leptospirosis. *The Lancet, Infectious Diseases*. 2004; 4: 543.
41. He P, Zhang X, Guo X, Hu B, Huang X, Yang Y, Zhao G. Identification and analysis of genes present in *Leptospira interrogans* serovar Lai but absent in *L. biflexa* serovar monvalerio. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2005; 37 (1): 46.
42. Hsieh W, Pan M. Identification *Leptospira santarosai* serovar Shermani specific sequences by suppression subtractive hybridization. *FEMS Microbiol Letters*. 2004; 235: 117 – 124.
43. Hsieh W, Chang Y, Chen C, Pan M. Omp52 is a growth-phase-regulated outer membrane protein of *Leptospira santarosai* serovar Shermani. *FEMS Microbiology letters*. 2005; 243: 339 – 345.
44. Karp G. *Biología Celular*. Edit. McGraw – Hill, México. 1992; 164 – 166.
45. Khandekar S, Bettencourt B, Kelley K, Recny M. A simple and rapid method for the purification of GroEL, an *Escherichia coli* homolog of the heat shock protein of 60 family of molecular chaperonins. *Protein expression and purification*. 1993; 4: 580 – 584.
46. Koizumi N, Watanabe H. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiol Letters*. 2003; 226: 215 – 219.
47. Koizumi N, Watanabe H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine*. 2004; 22:1545-1552.
48. Levett P. Leptospirosis. *Clin Micro Rev*. 2001; 14:296 – 326.

49. Matos C, Giongo V, George A, Ribeiro, E, Silva J, Cota M. Effects of hydrostatic pressure on the *Leptospira interrogans*: high immunogenicity of the pressure-inactivated serovar Hardjo. *Vaccine*. 2001; 19: 1511 – 1514.
50. Matsunaga J, Young T, Barnett J, Barnett D, Bolin C, Haake D. Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein. *Inf Imm*. 2002; 70:(1) 323-334.
51. Matsunaga J, Barocchi M, Croda J, Young T, Sanchez Y, Siqueira I, Bolin C, Reis M, Riley L, Haake D, Ko A. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molecular Microbiology*. 2003; 49:(4) 929-945.
52. Matsuo K, Isogal E, Araki Y. Utilization of exocellular mannan from *Rhodotorula glutinis* as an immunoreactive antigen in diagnosis of Leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:3750 – 3754.
53. Midwinter A, Vinh T, Faine S, Adler B. Characterization of an antigenic oligosaccharide from *Leptospira interrogans* serovar Pomona and its role in immunity. *Inf Imm*. 1994; 62:(12) 5477 – 5482.
54. Mini – PROTEAN II electrophoresis cell instruction manual (BIO-RAD); 3 – 20.
55. Myers D. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. Organización Panamericana de la Salud. 1985; 31 y 32.
56. Nally J, Timoney J, Stevenson B. Temperature – regulated protein synthesis by *Leptospira interrogans*. *Inf imm* 2001; 1:(69) 400 – 404.

57. Nally J, Artiushin S, Timoney J. Molecular characterization of thermoinduced immunogenic proteins Q1p42 y Hsp 15 of *Leptospira interrogans*. *Inf Imm*. 2001; 69:(12) 7616 – 7624.
58. Nascimento A, Ko A, Martins E, Monteiro-Vitorello C, P, Haake D, Verjovski-Almeida S, Hartskeerl R, Marques M, Oliveira M, Menck C, Leite L, Carrer H, Coutinho L, Degraeve W, Dellagostin O, El-Dorry H, Ferro E, Ferro M, Burlan L, Gamberini M, Giglioti E, Go´es-Neto A, Goldman G, Goldman M, Harakava R, Jerónimo S, Junqueira I, Kimura E, Kuramae E, Lemos E, Lemos M, Marino C, Nunes L, de Oliveira R, Pereira G, Schriefer R, Siquiera W, Sommer P, Tsai S, Simpson A, Ferro J, Camargo L, Kitajima J, Setúbal J, Van Sluys M. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol*. 2004; 186:(7) 2164-2172.
59. Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sugunan A, Sharma S, Sehgal S. Leptospiral proteins expressed during acute & convalescent phases of human leptospirosis. *Indian J Med Res*. 2004; 120:151-159.
60. Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sharma S, Sugunan A, Sehgal S. Phenotypic and genotypic conservation of *ompL1* and *lipL41* among leptospiral isolates of Andaman islands. *Indian J Med Res*. 2005; 122: 343 – 347.
61. Nunez P, Thiermann A, Bassford P, Stamm L. Identification and characterization on the protein antigens of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Inf Imm*. 1985; 48:(2) 492 – 497.
62. Pávková I, Hubálek M, Zechovská J, Lenco J, Stulik J. Francisella tularensis live vaccine strain: Proteomic analysis of membrane proteins enriched fraction. *Proteomics*. 2005; 5: 2460 – 2467.

63. Pereira M, Matsuo M, Bauab A, Vasconcelos S, Moraes Z, Baranton G, Girons S. A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans* sensu stricto is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. J of Clin Microbiol. 2000; 38:450 – 452.
64. Phadnis S, Parlow M, Levy M, Caulkins C, Connors J, Dunn B. Surface localization of Helicobacter pylori urease and heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. Inf Imm. 1996; 3:(64) 905 - 912.
65. Priya C, Bhavani K, Rathinam S, Muthukkaruppan V. Identification and evaluation of LPS antigen for serodiagnosis of uveitis associated with leptospirosis. J Clin Microbiol. 2003; 52:667-673.
66. ReadyStrip IPG Strip Instruction Manual. BIO-RAD.
67. Rossetti C, Auteri C, Venzano A, Samartino L. Asilamiento de 2 cepas de *L. interrogans* (Serogrupo *pomona*) de 2 rodeos bovinos. Vet Arg. 1999; 16:418 – 422.
68. Setubal J, Reis M, Matsunaga J, Haake, D. Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes. Microbiology. 2006; 152: 113 – 121.
69. Shang E, Exner M, Summers T, Martinich C, Champion C, Hancock R, Haake D. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. Inf Imm. 1995; 63:(8) 3174 – 3181.
70. Shang E, Summers T, Haake D. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. Inf Imm. 1996; 6:(64) 2322 – 2330.

71. Simao R, Susin M, Alvarez C, Gomes S. Cells lacking ClpB display a prolonged shutoff phase of the heat shock response in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*. 2005; 57:(2) 592 – 603.
72. Smits H, Van Der Hoorn M, Goris M, Gussenhoven G, Yersin C, Sasaki D, Terpstra W. Simple latex Agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:1272 – 1275.
73. Trueba G, Bolin C, Zuerner R. Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. *J of Bacteriol*. 1992; 174:(14) 4761 – 4768.
74. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Peñafiel N. Adaptación de *Leptospira interrogans (sensu stricto)* al agua dulce. *REV CUBANA MED TROP*. 2002; 54(1) 11-14.
75. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *International Microbiology*. 2004; 7:35–40.
76. Yan K, Ellis W, Mackie D, Taylor M, McDowell S, Montgomery J. Development of an ELISA to detect antibodies to a protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in cattle. *Vet Microbiol*. 1999; 69: 173-187.
77. Yiu M, Ooi G, Yuen K, Tsang K, Lam W, Chan F. High resolution CT of Weil's disease. *The Lancet*. 2003; 362:117.

78. Zaragoza C, Barrera R, Centeno F, Tapia J, Mañe´ M. Characterization of renal damage in canine leptospirosis by sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and western blotting of the urinary proteins. *J Comp Path.* 2003; 129:169–178.
79. Zhang X, Yu Y, He P, Zhang Y, Hu B, Yang Y, Nie Y, Jiang X, Zhao G, Guo X. Expression and comparative analysis of genes encoding outer membrane proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in epidemic leptospiras. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* 2005; 37:(10) 649 – 656.

APÉNDICE DE CULTIVOS Y SOLUCIONES

MEDIO DE CULTIVO – EMJH 1 litro 1x

Ingredientes de medio basal

a) En 800 ml de agua destilada se agrega y disuelve:

- Fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4) 1.0 g
- Fosfato monopotásico anhidro (KH_2PO_4) 0.3 g
- Cloruro de sodio (NaCl) 1.0 g

Agregar Soluciones Stock cada una en 100 ml de agua destilada.

- Cloruro de amonio (NH_4Cl) 25 g / 100 ml dH_2O 1.0 ml
- Tiamina HCl .5 g de Tiamina HCl / 100 ml dH_2O 1.0 ml
- Piruvato de sodio 10 g / 100 ml dH_2O 1.0 ml
- Glicerol al 10% 1.0 ml

b) En 150 ml de agua destilada se agrega y se disuelve:

- Suero de albúmina bovino 10 g

c) En 50 ml de agua destilada se agrega y se disuelve:

- Piruvato de sodio 0.2 g
- Sulfato de sodio anhidro (CH_3COONa) 0.1 g
- Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.01 g
- Tween 80 1.250 ml

Soluciones Stock en 100 ml de dH₂O.

1. Cloruro de calcio	(CaCl ₂)	1.5 g / 100 ml dH ₂ O	0.7 ml
2. Cloruro de magnesio	(MgCl ₂ ·2H ₂ O)	1.5 g / 100 ml dH ₂ O	0.7 ml
3. Sulfato de zinc	(ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	0.4 g / 100 ml dH ₂ O	1.0 ml
4. Sulfato de cobre	(CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.3 g / 100 ml dH ₂ O	0.1 ml
5. Vitamina B ₁₂		0.1 g / 100 ml dH ₂ O	0.2 ml
6. Glicerol 20%		20 ml glicerina / 100 ml dH ₂ O	0.5 ml
7. Sulfato manganoso	(MnSO ₄ ·4H ₂ O)	0.1 g / 100 ml dH ₂ O	1 ml

Procedimiento para el medio basal

1. Los ingredientes del medio basal se agregan en un matraz con 800 ml de dH₂O, se mantiene en agitación hasta disolver por completo.
 2. Ajustar pH a 7.4.
 3. Filtrar con filtro de .22 mm.
 4. Embasar en un matraz estéril y esterilizar.
 5. Almacenar a 30° C por 48 hrs
- *(Myers D, 1985).

Procedimiento para los demás ingredientes

1. En un vaso de precipitado disolver albúmina en 150 ml de dH₂O.
2. En otro vaso de precipitado disolver los ingredientes del inciso c.
3. Ya disuelto se pasan los ingredientes del paso 2 al vaso donde se disolvió la albúmina dando un volumen de 200 ml.
4. Mezclar y ajustar pH a 7.4.
5. Realizar filtrado con filtros de .65, .45 y .22 mm no estéril y por último hacer filtrado con filtro de .22 mm estéril y se vacía a un matraz estéril.
6. Almacenar a 30° C por 48 hrs.
7. A las 48 hrs. Se observará si las soluciones están limpias y no están precipitadas.

8. Se procede a realizar el vaciado de los 200 ml en el matraz donde se encuentra el medio basal.
9. En tubos de 10 ml se hace el embasado del medio para posteriores cultivos de la bacteria.
10. Los tubos pueden permanecer a temperatura ambiente.

2x TNE-PI	por ml
20mM Tris-HCl pH 8.0	637 microlitros dH ₂ O
300mM NaCl	200 microlitros 0.1M Tris-HCl pH 8.0
4mM EDTA	150 microlitros 2M NaCl
0.5% (v/v) inhibidores de proteasas	8 microlitros 0.5M EDTA pH 8.0
	5 ml de cocktail de inhibidores de proteasa (Sigma #P8849).

1xFSB/0.25mM PMSF

FSB	Tris hidrocloreuro 62.5 mM pH 6.8
	Glicerol 10%
	SDS 2%

PBS-5mM MgCl₂ 1 litro.

CaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
K ₂ HPO ₄	0.24 g

*Se disuelven ingredientes en 600 ml de H₂O MQ

*Ajustar pH a 7.4 y se aforó a 1000 ml

1.5 M Tris-HCl pH 8.8

Tris base 18.15 g

H₂O 60 ml

Se ajustó el pH a 8.8 y se aforó a 100 ml.

0.5 M Tris-HCl pH 6.8

Tris base 6 g

H₂O 60 ml

Se ajustó pH a 6.8 y se aforó a 100 ml

Amortiguador de muestra

H₂O 4 ml

0.5 M Tris-HCl pH 6.8 1 ml

Glicerol .80 ml

SDS al 10% 1.6 ml

2-mercaptoetanol .4 ml

0.035% azul de bromofenol .2 ml

Amortiguador para corrimiento 5x 1 litro

Tris base 15 g

Glicina 72 g

SDS 5 g

Disolver en 600 ml y aforar a 1000 ml

*Para hacer el corrimiento se debe usar a 1x

Gel de Separación al 12%

dH ₂ O	3.35 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5 ml
SDS 10%	100 µl
Acrilamida/ Bis	4.0 ml
Persulfato de Amonio	50µl
TEMED	5 µl

Gel de Concentración al 12%

dH ₂ O	6.1 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	2.5 ml
SDS 10%	100 µl
Acrilamida/ Bis	1.33 ml
Persulfato de Amonio	50µl
TEMED	10 µl ²²

Se corre a 50V el gel de concentración y a 100V el gel de separación
(Mini Protean II BIO-RAD)

Tinción de Coomassie

Metanol	25%
Ac. Acético	7%
Azul de Coomassie	.2%

Solución desteñidora de Coomassie

H ₂ O	60%
Etanol	40%
Ac. Acético	10%

Amortiguador de Towbin SDS (Sigma) 0.037%

Tris base 25 mM

Glicina 192 M

Metanol 20%

Ajustar pH a 8.1 – 8.5

Almacenar a -20 °C

MA: carbonato de sodio, bicarbonato de sodio y tartrato en 0.2 N hidroxido de sodio.

MB: solución acuosa de detección BCA

MC: 4% de sulfato cúprico penta hidratado

Albúmina (BSA).

PBS 5 mM.

Cuadro 2

Buffer de rehidratación de muestra

Método estándar	Pautas de optimización
8 M urea	8 – 9.8 urea*
2% CHAPS	1 – 4% CHAPS*
50 mM DTT	15 – 100 mM DTT* (ditiotreitól) ó 2 mM tributilfosfina**
0.2% Bio – Lyte amfolitos	1x de Buffer ReadyStrip 0.1 – 0.4% (w/v) Bio – Lyte amfolitos

* Las cantidades de urea, CHAPS, DTT, y Bio – Lyte amfolitos requeridos dependen de la solubilidad de la muestra.

** La tributilfosfina es un agente reductor alternativo para DTT (ReadyStrip IPG BIO-RAD).

Equilibrio de las tiras IPG

1. Sacar la tira de la cámara de isoelectroenfoque.
2. Retirar exceso de aceite con dH_2O , colocar en papel filtro para eliminar excesos.
3. Agregar en un tubo de ensaye :
 - 7 ml de solución de equilibrio
 - 500 μl de DTT 1M
 - 1.4 ml SDS 10%
4. Colocar tira en solución y dejar en agitación leve por 15 minutos.
5. Preparar en otro tubo:
 - 7 ml de solución de equilibrio
 - 250 mg de iodoacetamida
 - 1.4 ml SDS 10%
6. Al término del paso 4, colocar la tira en el tubo del paso 5 y dejar en agitación leve por 15 minutos.
7. Al término del paso anterior se puede colocar la tira sobre un papel filtro ligeramente mojado con dH_2O .

SDS-PAGE al 15% (un gel)

Monómero (Acrilamida)	11 ml
Tris 1,5 M pH 8.8	5.5 ml
dH_2O	5.17 ml
SDS 10%	220 μl
PSA 10%	110 μl
Temed	7.33 μl

Correr gel de 70 a 200 V

Fijación, tinción y revelado de los geles

1. Agitar en solución de fijación por una noche
2. Agitar en solución de incubación por dos horas
3. Lavar con dH₂O tres veces por veinte minutos cada una
4. Agitar en solución de nitrato de plata por treinta minutos
5. Lavar ligeramente con dH₂O por no más de treinta segundos
6. Poner en solución reveladora (este paso depende de la cantidad de proteína que se colocó en el gel, de cinco a treinta minutos)
7. Si se ha alcanzado el nivel de intensidad deseado, transferir el gel a la solución de paro mínimo quince minutos
8. Cambiar solución de paro por otros quince minutos

Solución de Incubación

30% Etanol, 0.5 M Acetato de Sodio, 0.5 % Glutaraldehído y 0.2% Tiosulfato de Sodio

Solución Reveladora

2.5% Carbonato de Sodio, 0.05% Tiosulfato de sodio y 0.01% Formaldehído

Solución de Paro

0.5 M EDTA y 0.02% Ácido Cítrico