



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

Estudio sobre la inmunogenicidad de la secretina GspD de *Leptospira*.

**T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

MVZ. MARIO HIDALGO RUIZ

**TUTOR:
DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA (UNAM)**

**COMITÉ TUTORAL:
DR. ROGELIO A ALONSO MORALES
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA (UNAM)**

**DR. JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

MÉXICO D. F.

FEBRERO 2014



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

En especial a dos personas que han sido los maestros de mi vida, quienes me han inculcado valores, forjado mi actitud y carácter, quienes sin condición alguna me han colmado de amor y con sus palabras y sabios consejos han sabido la mejor manera de orientarme y guiarme en mi camino. Gracias Dios por darme como regalo de vida a esas dos personas que más que amigos son mis padres: Macrina de Jesús Ruiz Peña y Mario Luis Hidalgo Morales.

A mis hermanos Limny Darany Hidalgo Ruiz y José Roberto Hidalgo Ruiz.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la fuerza para lograr mis metas.

A mis padres y hermanos por todo su apoyo y ejemplo a seguir.

Por todo el tiempo y apoyo que me brindaron, en especial a:

Biol. Amanda Gayosso Vázquez

Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dr. Rogelio A Alonso Morales

A los integrantes del GrILLeP (Grupo de Investigación en *Leptospira* y Leptospirosis): Luz Olivia Castillo Sánchez, Carlos Alfredo Carmona Gasca y José Manuel Ramírez Ortega.

A los integrantes del Laboratorio de Genética Molecular: Angélica Lizeth Toiber Estrella, Luz Selene Gonzales Delgado, Vianey Ramírez Andoney, Zoalli Uribe Villanueva, Mario Espinosa Rodríguez, Eduardo Aguilar Huerta, Jorge Vázquez Bucheli, Pablo Pintor Ríos, Rodrigo Téllez Núñez y Alejandro Valdez Rosas.

A todos los amigos que conocí en el CEIEPAA.

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Por el financiamiento de la investigación, a los proyectos:

PAPIIT IN221409

SEP-CONACYT 2008-C01-92668

RESUMEN

Palabras clave:

Leptospira, Secretina, GspD, T2S.

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa y transmisible que afecta a casi todos los mamíferos, en salud pública es un problema emergente con un estimado de 500,000 casos reportados por año. La prevención de la leptospirosis, se ha dado tradicionalmente mediante la aplicación de bacterinas preparadas con cultivos de serovariedades asociadas a la especie animal afectada y al área geográfica. La búsqueda de mejores inmunógenos se ha enfocado a proteínas de membrana externa que sean conservadas en serovariedades patógenas. GspD es la secretina del sistema de secreción tipo 2 (T2S), se encuentra sobre la superficie externa en bacterias Gram negativas y tiene una alta homología entre diferentes serovariedades patógenas de *Leptospira*, es expresada durante la infección y es antigénica. El objetivo del presente estudio fue hacer la clonación, expresión de la secretina y el análisis *in silico* de GspD para determinar epítopes en la región expuesta de la proteína. A partir de ADN genómico de *Leptospira interrogans* (*L. interrogans*) serovariedad Canicola cepa LOCaS46, con iniciadores específicos, se logró la amplificación de 1,818 pb correspondientes al gen *gspD* incluyendo el péptido señal, se logró su clonación en un vector T comercial y en pET11a para su expresión, sin embargo, no fue posible su expresión en células de *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 y Rosetta DE3 inducidas con IPTG 1mM. Con el análisis *in silico* de GspD, se determinaron dos regiones potencialmente inmunogénicas en la región carboxilo de la proteína (405- PQVLTVDNQEAEISVGQDVPVRTQSRNAGTGGTN AVTVDNYEYRPTGIKLFKFTPHV NK -462 y 505- SIVIGGLISNDKQKRIIKIPFLGDI PYLGHLFKRTTEKIKKTNLMVFITPHILDSRETADKMTVK -569), que corresponde a la parte extracelular de la proteína y contiene el dominio funcional de la secretina.

ABSTRACT

Keywords

***Leptospira*, secretin, GspD, T2SS.**

Leptospirosis is an infectious and transmissible disease that affects almost all mammals, including humans. The disease is currently considered an emergent problem in public health with an estimated 500,000 cases each year. Leptospirosis prevention has traditionally been approached by bacterins prepared with cultures of serovars associated to specific animal species in certain geographical areas. Currently, research has focused on outer membrane proteins (OMP), conserved in pathogenic serovars such as LipL41, LipL32, OmpL1, LigA and B. GspD is the secretin of the type 2 secretion system (T2SS), has a high homology between different pathogenic serovars of *Leptospira*, is expressed during infection, and is antigenic. The purposes of this study were to clone and subsequently express the *Leptospira interrogans* (*L. interrogans*) serovar Canicola GspD secretin followed by an *in silico* protein analysis, to determinate its immunodominant region. With specifically designed primers, the *gspD* gen including its signal peptide coding sequence, was amplified from genomic DNA of *L. interrogans* serovar Canicola strain LOCaS46 (1,818 pb). Once *gspD* was cloned into pET11a, the construction was transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 and Rosseta DE3 with the aim of expressing the recombinant protein. *E. coli* were induced with 1 mM IPTG, but no expression was obtained. The *in silico* analysis, determined the carboxylic region of GspD as the immunodominant region. This region corresponds to the extracellular portion of GspD containing the functional domain of the secretin, and was determined to contain two immunogenic regions (405-PQVLTVDNQAEISVGQDVPVRTQSRNAGTGGTNAVTVDNYEYRPTGIKLFKFTP HVNK -462 y 505- SIVIGGLISNDKQKRIKIPFLGDIPYLGHLFKRTTEKIKKTNL MVFITPHILDSRETADKMTVK -569) using the BcePred Prediction Server and ABCPred programs.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	3
	<i>Leptospira</i> y leptospirosis	3
	Proteínas de membrana externa e inmunogenicidad.....	8
	Sistema de Secreción Tipo II.....	10
	GspD la secretina del T2S.....	13
	Sistema pET para la expresión de proteínas recombinantes	19
	Objetivos.	21
	Objetivo general	21
	Objetivos específicos	21
	Hipótesis.	21
III.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
	Extracción de ADN.	22
	Cepas utilizadas	23
	Vector T.....	23
	pET11a.....	26
	Preparación de bacterias competentes con CaCl ₂	27
	Clonación del gen <i>gspD</i> en el Vector T.....	28
	Amplificación de <i>gspD</i>	28
	Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	31
	Reacción de ligación y transformación.	32
	Escrutinio para colonias recombinantes (<i>gspD</i> / Vector T)	32
	Extracción de ADN de plásmido.....	36
	Clonación del gen <i>gspD</i> en pET11a.	37
	Escrutinio de las colonias recombinantes obtenidas	37

Expresión y evaluación de la antigenicidad de rGspD mediante sistemas de inmunotransferencia Western.....	39
Determinación de la transcripción de <i>gspD</i>	40
Determinación <i>in silico</i> de epítopes específicos de GspD.....	44
IV. RESULTADOS.....	45
Amplificación de <i>gspD</i>	45
Escrutinio de las colonias DH5 α recombinantes con <i>gspD</i> +Vector T.....	45
Digestión del constructo <i>gspD</i> + Vector T.....	48
Escrutinio y secuenciación de colonias recombinantes con pET11a + <i>gspD</i>	48
Escrutinio de colonias BL21 y Rosetta DE3 recombinantes con pET11a+ <i>gspD</i>	49
Ensayo de inducción con IPTG para la expresión de GspD en células BL21	53
Ensayo de inducción con IPTG para la expresión de GspD en células Rosetta DE3.....	59
Determinación de epítopes de GspD.....	68
V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	76
Perspectivas.....	81
VI. REFERENCIAS	82
ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS	90
Apéndice 1	93
Apéndice 2.	95

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Especies de <i>Leptospira</i>	7
Cuadro 2 Peso molecular de la secretina GspD de <i>E. coli</i> y otras proteínas homólogas.	15
Cuadro 3 Condiciones de la PCR para la amplificación de <i>gspD</i> con los iniciadores P11F+R	29
Cuadro 4 Reacción de ligación de <i>gspD</i> con el Vector T	34
Cuadro 5 Condiciones de la PCR de escrutinio para la evaluación de la inserción de <i>gspD</i> en el Vector T con los iniciadores M13F+R	34
Cuadro 6 Condiciones de la PCR de escrutinio para la evaluación de la inserción de <i>gspD</i> en el Vector T y en pET11a con los iniciadores P11F+R	35
Cuadro 7 Reacción de digestión.	35
Cuadro 8 Reacción de ligación de <i>gspD</i> con pET11a	42
Cuadro 9 Condiciones para la RT-PCR en un sólo paso	42
Cuadro 10 Codones raros en <i>E. coli</i> presentes en <i>gspD</i>	59
Cuadro 11 Análisis Blast-n y Blast-p de <i>gspD</i> y GspD de LOCAS46	69
Cuadro 12 Composición atómica de GspD	70
Cuadro 13 Inducción de la expresión de la proteína en BL21 a una absorbancia de 0.35	93
Cuadro 14 Inducción de la expresión de la proteína en BL21 a una absorbancia de 0.6	93
Cuadro 15 Inducción de la expresión de la proteína en BL21 a una absorbancia de 1	94
Cuadro 16 Inducción de la expresión de la proteína en Rosetta DE3 a una absorbancia de 0.5	94
Cuadro 17 Iniciadores empleados para la PCR	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. El ciclo de infección por <i>Leptospira</i>	6
Figura 2. Sistema de Secreción Tipo II (T2S)	12
Figura 3. Esquematización del operón del T2S.....	16
Figura 4. Interacción de unidades proteicas de GspC y GspD	17
Figura 5. Comparación entre la arquitectura de las secretinas de diferentes sistemas de secreción	17
Figura 6. Dominios de GspC y GspD que interactúan en el periplasma.....	18
Figura 7. Sistema pET de expresión	20
Figura 8. Mapa del plásmido pRARE	24
Figura 9. Mapa del Vector T (pTZ57R/T)	25
Figura 10. Vector pET11a.....	26
Figura 11. Termociclado para la amplificación de <i>gspD</i> con iniciadores P11F+R, pET11aF+R ó M13F+R.....	30
Figura 12. Termociclado empleado para la RT-PCR.....	43
Figura 13. PCR de gradiente para la amplificación de <i>gspD</i>	46
Figura 14. PCR de escrutinio con iniciadores M13 (<i>gspD</i> + Vector T) y con iniciadores P11Fy R (<i>gspD</i> + Vector T).....	47
Figura 15. Extracción de ADN de plásmido y digestión.....	50
Figura 16. PCR de escrutinio a colonias DH5a recombinantes con pET11a y <i>gspD</i>	51
Figura 17. PCR de confirmación de ligación	52
Figura 18. PCR de escrutinio a colonias de BL21 y Rosetta recombinantes con pET11a+ <i>gspD</i>	54
Figura 19. Inducción de la expresión de la proteína a una absorbancia de 0.35 ...	55
Figura 20. Inducción de la expresión de la proteína a una absorbancia de 0.6	56
Figura 21. Gel de poliacrilamida del ensayo de inducción de la proteína a 0.6 de absorbancia	57
Figura 22. Inducción de la expresión de la proteína a una absorbancia de 1	58
Figura 23. Ensayo de inducción con IPTG a una Absorbancia de 0.5.....	60
Figura 24. Gel de acrilamida del ensayo de inducción en Rosetta.	61
Figura 25. Inmunodetección Western con anticuerpos anti-His	63
Figura 26. Inmunodetección Western con anticuerpos anti- <i>Canicola</i> de referencia	64
Figura 27. Inmunodetección Western con anticuerpos de bovinos positivos en la prueba de aglutinación microscópica	65
Figura 28. Inmunodetección Western con anticuerpos anti-GspD de <i>Leptospira borgpetersenii</i> serovariedad Hardjo (Hardjobovis)	66

Figura 29. RT-PCR para la evaluación de la transcripción.....	67
Figura 30. Distribución de los aminoácidos en GspD.....	71
Figura 31. Regiones hidrofóbicas de GspD	72
Figura 32. Determinación de las regiones de GspD.....	72
Figura 33. Predicción de péptidos inmunodominantes de GspD	74
Figura 34. Predicción de la región inmunodominante de GspD	75

I. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa y transmisible que afecta a casi todos los mamíferos, primordialmente a perros, cerdos y bovinos, así como a otras especies domésticas y silvestres. La presencia de roedores es considerada el principal factor de riesgo para animales susceptibles. El humano adquiere la infección a través del contacto directo o indirecto con la orina de animales enfermos o de animales portadores, es un problema emergente en salud pública con un estimado de 500,000 casos reportados por año (WHO, 2011), pero muchos casos no son reportados debido a una ausencia en la vigilancia y diagnóstico de la enfermedad (Reis *et al.*, 2008). La infección puede presentarse en forma aguda, subaguda o crónica, generando anemia hemolítica, mortinatos y abortos en todas las especies afectadas, neonatos débiles, infertilidad, entre otras manifestaciones clínicas causando importantes pérdidas económicas (Radostits *et al.*, 2006). La prevención de la leptospirosis se ha realizado mediante la aplicación de bacterinas preparadas con cultivos de serovariedades prevalentes en áreas geográficas determinadas y en las especies animales afectadas, algunas de estas bacterinas se elaboran con base en hallazgos serológicos y la inmunidad que confieren es específica de serovariedad y de corta duración. La búsqueda de mejores inmunógenos se ha enfocado a proteínas de membrana externa como LipL41, LipL32, OmpL1, LigA y B con resultados variables. Por otra parte, GspD la secretina de la vía de secreción general (gsp, siglas del inglés general secretion pathway) o sistema de secreción tipo 2 (T2S), forma un anillo dodecamérico en la membrana externa de las bacterias que poseen este sistema a través del cual se secretan diversos factores de virulencia (toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano). Se han hecho estudios que muestran que la secretina GspD de *Leptospira* tiene una alta homología entre diferentes serovariedades patógenas, es expresada

durante la infección y es antigénica (Mena Bañuelos, 2006; Rodríguez Reyes, 2007; Alcaraz Sosa, 2008; Núñez Carrera, 2009; Ordóñez López, 2010). Sin embargo se desconocen las regiones inmunogénicas de esta proteína.

Por lo que en este estudio se planteó hacer, mediante técnicas moleculares, la clonación y expresión de GspD de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 y el análisis bioinformático de esta proteína.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

***Leptospira* y leptospirosis**

La leptospirosis es una zoonosis infecciosa y contagiosa que prevalece en el mundo con brotes emergentes, afecta principalmente a perros, cerdos y bovinos. Diversas especies de animales silvestres como roedores, zarigüeyas, mapaches, nutrias, comadrejas entre otros, portan leptospirosis patógenas en los túbulos renales siendo importantes huéspedes de mantenimiento; sin embargo, los roedores son considerados el principal reservorio de leptospirosis patógenas. Animales con infección renal crónica por serovariedades patógenas, eliminan a la bacteria a través de orina, cuando la orina o fuentes de agua contaminadas con dicha orina entran en contacto con piel lesionada, reblandecida o con alguna superficie mucosa de animales susceptibles, se puede producir una infección sistémica con cuadros clínicos agudos o crónicos (Figura 1). Lacereaux en 1802 hizo la primera descripción clínica de leptospirosis y en 1883 Landarouzi describió un caso típico con ictericia y hemorragias denominándolo tifus hepático. La primera descripción de leptospirosis clínica moderna fue publicada en Alemania por Weil en 1886, en la cual se describieron cuadros agudos febriles con ictericia y manifestaciones de daño renal. Goldschmidt en 1887 fue quien propuso el nombre de enfermedad de Weil. En 1914 los japoneses Inada e Ido encontraron una espiroqueta en el hígado de cuyos infectados con sangre de mineros con cuadros febriles, estos cuyos presentaron cuadros hemorrágicos y es por esta razón que llamaron al agente encontrado *Spirochaeta Icterohaemorrhagiae* (Inada *et al.*, 1916). Este mismo equipo relacionó este microorganismo con las ratas de desagüe, encontrando que el 40% de esas ratas eran portadoras de la *Spirochaeta Icterohaemorrhagiae*. Cuando la enfermedad se confundía con la fiebre amarilla (enfermedad vírica aguda y hemorrágica), Noguchi propuso la

creación del género *Leptospira* y en 1920 realizó los primeros trabajos sobre leptospirosis en Yucatán (Noguchi and Kligler, 1920). Varela *et al.* (1972), encontraron personas y animales seropositivos, principalmente en Campeche, Tabasco, Colima y el Distrito Federal.

Las leptospiras penetran por piel lesionada o mucosas, entran al torrente sanguíneo y se diseminan a través de los tejidos, la infección causa un cuadro febril agudo durante la fase de leptospiremia y progresa durante la respuesta inmune tardía hasta causar severas manifestaciones multisistemicas como daño y disfunción hepática, falla renal aguda, síndrome hemorrágico pulmonar, miocarditis y meningitis. Eventualmente, la respuesta inmune elimina las leptospiras patógenas, pero pueden persistir por periodos prolongados en sitios inmunoprivilegiados, como los túbulos renales y el humor vítreo, donde pueden llegar a causar cuadros de leptospiruria incluso después de semanas de la resolución de la enfermedad y uveítis después de meses de la exposición, respectivamente (Ko *et al.*, 2009).

El género *Leptospira* pertenece al Filo Spirochaetes, Clase Spirochaetia, Orden Spirochaetales y a la Familia Leptospiraceae. Las leptospiras pueden ser patógenas o saprófitas, estas últimas se encuentran en muchos tipos de medio ambiente húmedo, que van desde las aguas superficiales y suelos húmedos con agua de grifo, en agua de mar han sido encontradas leptospiras halófilas saprófitas (Terpstra, 2003). Son microorganismos con pared semejante a la de las bacterias Gram negativas, la tinción de Gram es ineficaz para observarlas, debido a que estas espiroquetas son delgadas y flexibles, de 5 μm a 20 μm de longitud y de 0.1 μm a 0.2 μm de diámetro (Brooks *et al.*, 2004; Levett and Haake, 2009). La técnica de elección para su observación es la microscopia en campo oscuro, aunque también puede visualizarse en tejidos por medio de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y tinciones con plata (Quinn *et al.*, 2002). Antes de 1979, el

género *Leptospira* contenía dos especies: *Leptospira biflexa* y *Leptospira interrogans* (Brenner *et al.*, 1999; Zunino E y Pizarro R, 2007), actualmente, se reconocen 20 especies (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=171&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=s>), de los cuales 16 agrupan más de 260 serovariedades patógenas (Brenner *et al.*, 1999; Faine *et al.*, 1999). Saito *et al.* (2012) han propuesto una nueva especie saprófita: *L. idonii* (Cuadro 1).

Todas las especies de *Leptospira* son muy sensibles a la desecación y a las variaciones del pH, no tolera medios ácidos, su desarrollo óptimo es a un pH de 7.2 a 7.4. Se logra su destrucción a los 10 min si la temperatura es de 56°C y en 10 segundos a una temperatura de 100°C (Laguna, 2000).

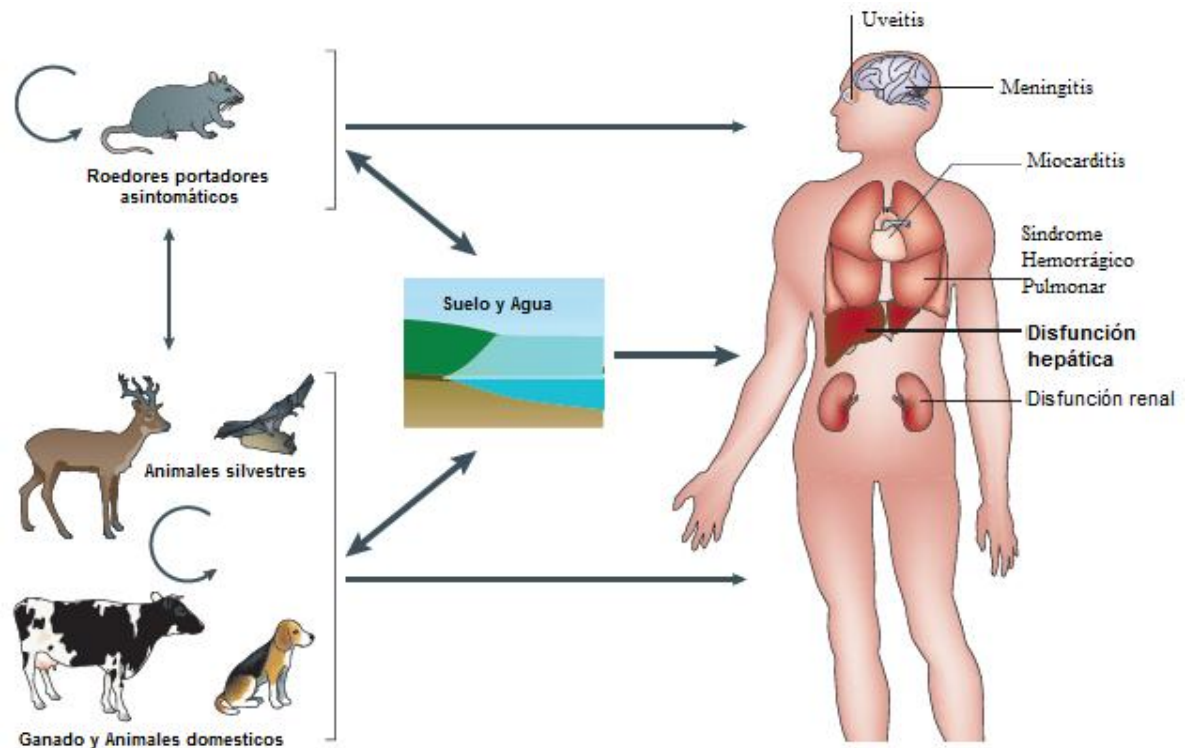


Figura 1. El ciclo de infección por *Leptospira*.

Los roedores son considerados como reservorios porque comúnmente alojan en sus riñones leptospiras patógenas sin sufrir signos clínicos y las eliminan al ambiente pudiendo infectar animales domésticos y salvajes causando diferentes manifestaciones clínicas y estados de portador. La leptospirosis es transmitida a humanos por contacto directo con la orina de animales portadores o por exposición a medio ambiente contaminado (suelo y agua), con orina de animales portadores (Modificado de Ko *et al.*, 2009).

Cuadro 1 Especies de *Leptospira*

Especies Patógenas	
<i>Leptospira alexanderi</i>	<i>Leptospira licerasiae</i>
<i>Leptospira alstonii</i> *	<i>Leptospira noguchii</i>
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	<i>Leptospira santarosai</i>
<i>Leptospira fainei</i>	<i>Leptospira terpstrae</i> *
<i>Leptospira inadai</i>	<i>Leptospira vanthielii</i> *
<i>Leptospira interrogans</i>	<i>Leptospira weilii</i>
<i>Leptospira kirschneri</i>	<i>Leptospira wolffii</i>
<i>Leptospira kmetyi</i>	<i>Leptospira yanagawae</i>
Especies Saprófitas	
<i>Leptospira biflexa</i>	<i>Leptospira broomii</i>
<i>Leptospira meyeri</i>	<i>Leptospira wolbachii</i>
<i>Leptospira idonii</i> (Eri-1). Nueva especie propuesta por Saito et al. (2013).	

* Especies consideradas de patogenicidad intermedia

Proteínas de membrana externa e inmunogenicidad

La organización de la pared celular de *Leptospira* es semejante a la de las bacterias Gram negativas. En su membrana externa (ME), el lipopolisacárido (LPS) representa el antígeno más importante, siendo la base para la clasificación serológica del género en serogrupos y serovariedades. Los anticuerpos contra el LPS de *Leptospira* son considerados protectores en hámsteres y cuyos; sin embargo, la protección que genera es serovariedad-específica, de corta duración (Levett, 2001) y no se dan las mismas condiciones en otras especies como en los bovinos, en donde títulos de anticuerpos elevados no evitan la infección (Bolin *et al.*, 1989). Por otro lado, otros antígenos superficiales incluyen a las proteínas de la membrana externa (PME), que en su mayoría están constituidas por lipoproteínas (Haake *et al.*, 2000). En la ME de serovariedades patógenas de *Leptospira* se han identificado 67 unidades proteicas, de las cuales por lo menos 12 son productos de distintos genes (Cullen *et al.*, 2002). Se ha demostrado que algunas de estas proteínas inducen respuestas inmunes con valor protector variable en animales de laboratorio. Se ha realizado la secuenciación del genoma de *Leptospira* y el primer genoma en ser secuenciado fue el de *Leptospira interrogans* serovariedad Lai. Este genoma tiene un tamaño de 4,691,184 pb, siendo mucho más grande que el de otras espiroquetas (*T. pallidum* con 1,138,000 pb, y *B. burgdorferi* 1,519,857 pb incluyendo plásmidos), en esta serovariedad el genoma incluye dos cromosomas circulares (Ren *et al.*, 2003), al igual que *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo cepas L550 y JB197 (Bulach *et al.*, 2006) y *L. interrogans* serovariedad Copenhageni (Nascimento *et al.*, 2004).

Las PME de *Leptospira* interactúan con los receptores tipo Toll 2 (TLR2 por sus siglas en inglés Toll like receptors), estimulando la activación de macrófagos e induciendo la producción de quimiocinas proinflamatorias y TNF α , favoreciendo la

inflamación temprana y probablemente el desarrollo de nefritis intersticial (Yang, 2007). La importancia de la interacción de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés) de *Leptospira* con los TLR se ha observado en ratones desprovistos de TLR2 y TLR4, que muestran susceptibilidad a la infección y mueren rápidamente de falla hepática y renal severas asociadas con la infección (Chassin *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha hecho evidente que la fagocitosis de *Leptospira* por neutrófilos y macrófagos es efectiva si el patógeno es opsonizado por inmunoglobulinas G (Fraga *et al.*, 2011).

A raíz de que se reportaron las proteínas de membrana externa (PME), comenzaron a ser evaluadas en cuanto a su inmunogenicidad. LipL32 que es la más abundante no ha demostrado ser tan eficaz en la protección contra la enfermedad; las proteínas Lig (LigA y LigB), interactúan con el huésped uniéndose a múltiples ligandos presentes en diferentes tejidos, esto sugiere que estas adhesinas pueden estar involucradas en las etapas de colonización inicial y diseminación de *Leptospira* (Choy *et al.*, 2007). Al estudiarlas para evaluar la inmunogenicidad que generan en hámsteres, estas demostraron una eficaz protección ante la enfermedad, pero el grupo control de animales utilizados tuvo un 75% de sobrevivencia (Palaniappan *et al.*, 2006). En un estudio similar, se determinaron los dominios de LigA, requeridos para generar una inmunoprotección (dominios 10 al 13), obteniendo una supervivencia del 100% después de un desafío intraperitoneal con *Leptospira interrogans* serovariedad Copenhageni, sin embargo al igual que en estudios anteriores, la inmunidad generada no fue suficiente para evitar el estado de portador (Haake *et al.*, 2011). Cullen *et al.* (2002), realizaron un análisis global de las PME en *Leptospira interrogans* serovariedad Lai cultivada a diferentes temperaturas (20, 30 y 37°C) y condiciones de desarrollo en presencia o ausencia de Fe, identificando la expresión de las lipoproteínas de membrana externa LipL32, LipL36 (periplasma), LipL41, LipL46,

LipL48 y también descubrieron nuevas PME, entre ellas a pL18. Nally *et al.* (2006), al estudiar el proteoma de la membrana externa de *Leptospira interrogans* durante una infección letal aguda, también demostraron la presencia de una PME putativa de 18kDa, esta proteína podría ser homóloga a pL18 (Cullen *et al.*, 2002). Un estudio de la secuencia de pL18 de *Leptospira* reveló una similitud del 45% con GspG de *E. coli*, una pseudopilina del sistema de secreción tipo II (T2S)¹.

Sistema de Secreción Tipo II

Los sistemas de secreción permiten a las bacterias secretar un gran número de proteínas, entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes etapas del ciclo de vida bacteriano. En bacterias Gram negativas, las proteínas a secretarse tienen que atravesar dos barreras lipídicas separadas por el espacio periplásmico: la membrana citosólica o interna (MI) y la ME, para ello, las proteínas son normalmente sintetizadas con un péptido señal en el extremo amino terminal, el péptido señal es el objetivo tanto del sistema Sec como del sistema Tat (twin-arginine translocation), ambos sistemas de translocación tienen como objetivo transportar la proteína del citoplasma al espacio periplásmico a través de la MI. Los sistemas de secreción que emplean el sistema Sec se denominan Sec dependientes; la diferencia clave entre estos dos sistemas de translocación

¹ De la Peña-Moctezuma, comunicación personal.

consiste en que el sistema Sec transporta polipéptidos en un estado no estructurado, mientras que la vía Tat transporta proteínas que están completamente plegadas (Figura 2), el sistema Tat se encuentra en algunas bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, la bacteria simbiótica fijadora de nitrógeno *Sinorhizobium meliloti* y la bacteria predadora *Bdellovibrio bacteriovorus*; en tanto que el sistema Sec es universalmente conservado en bacterias Gram negativas (Palmer and Berks, 2012).

Una vez que la proteína se encuentra en el espacio periplásmico, esta es transportada al exterior de la célula a través de la ME con ayuda de un sistema de secreción como el T2S, también conocido como la vía general de secreción (gsp por sus siglas en inglés), este sistema está constituido por entre 12 a 16 proteínas. Ordoñez López (2010) menciona que en *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola este sistema cuenta con 17 proteínas (GspA, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P y Q). La mayoría se localizan en la MI y el periplasma, este sistema cuenta con una ATPasa denominada GspE que se localiza en la región citosólica e interactúa con el componente GspL localizado en la MI (Figura 2). En la mayoría de las especies, los genes que codifican para las proteínas del T2S están agrupados en un operón principal compuesto de los genes *gspC, D, E, F, G, h-H, I, J, K, L, M, N* y *O* (*gspC-O*) y en algunos casos, los operones comprenden los genes *gspA* y *gspB* (como en el caso de *Leptospira*) y otros que codifican *gspS* (Sandkvist, 2001; Fronzes *et al.*, 2009); es preciso mencionar que la nomenclatura de estos genes y de la proteína que codifican puede variar en las diferentes especies bacterianas (Figura 3).

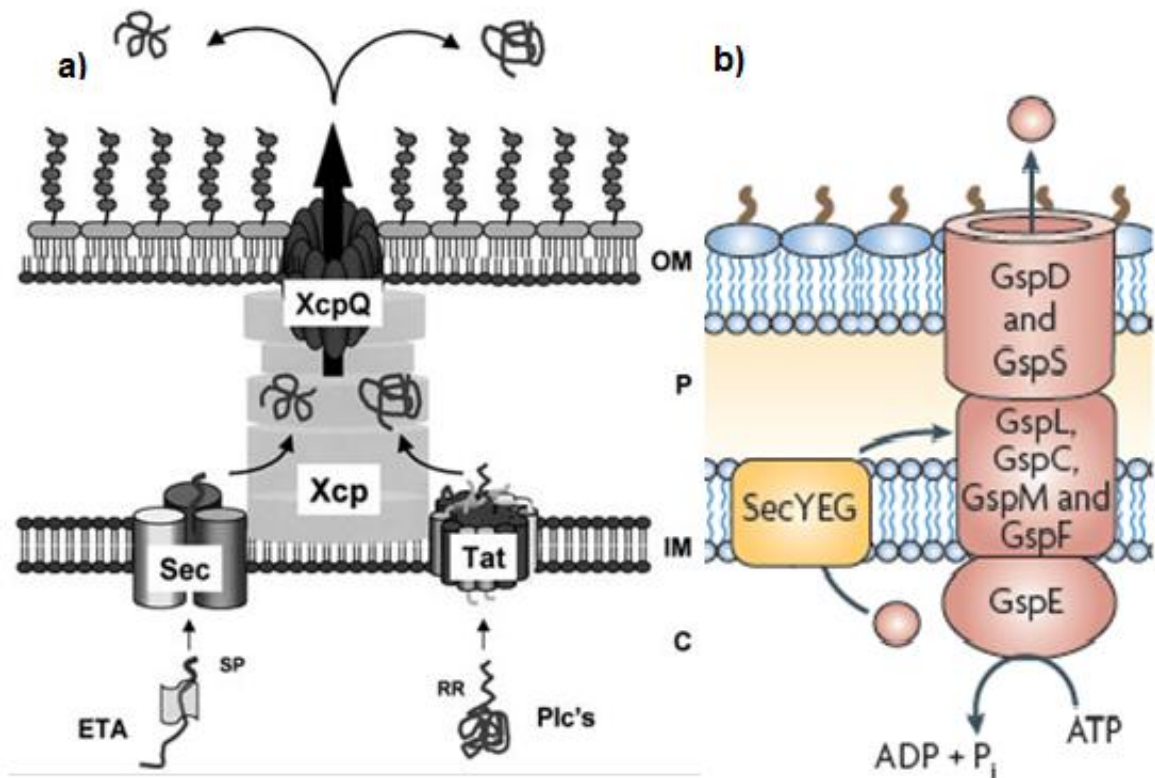


Figura 2. Sistema de Secreción Tipo II (T2S)

Sistema constituido por entre 12 y 16 proteínas. a) Modelo de la secreción de una proteína vía T2S en *Pseudomonas* mostrando su interacción con la maquinaria Sec o Tat dependiendo de la conformación de la proteína a ser secretada; XcpQ es el homólogo en *Pseudomonas* para GspD en *E. coli.*, b) Esquematación de la estructura del T2S. OM= Membrana Externa; P= Periplasma; IM= Membrana Interna; C= Citoplasma; (Modificado de Voulhoux *et al.*, 2001; Fronzes *et al.*, 2009).

GspD la secretina del T2S

El T2S permite a las bacterias secretar un gran número de proteínas al medio extracelular a través del poro formado por doce copias de la secretina GspD (Figura 4). Las secretinas son proteínas de membrana externa con un peso molecular de entre 50 a 70 kDa. Rodríguez Reyes (2007), señala que el peso molecular de GspD es diferente entre géneros bacterianos siendo menor en *Leptospira* (Cuadro 2). La secretina GspD está conservada entre los diferentes T2S, estas secretinas forman una súper familia involucrada en sistemas de transporte de grandes substratos macromoleculares a través de la membrana externa, incluyendo la maquinaria de extrusión del fago filamentoso (Linderoth *et al.*, 1996), el Sistema de Secreción Tipo 3 (T3S) (Koster *et al.*, 1997) y el proceso de polimerización del pili tipo 4 (Martin *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 2001) (Figura 5). Los residuos C-terminal 300 a 400 de GspD contienen los segmentos más conservados de esta súper familia de las secretinas, con estos segmentos se forma el poro en la membrana externa (Korotkov *et al.*, 2011). La secretina GspD está conservada entre los diferentes T2S, también es un componente del Sistema de Secreción Tipo 3 (T3S) y del proceso de polimerización del pili tipo 4 (Figura 5). En algunos T2S, la lipoproteína GspS actúa como chaperona de GspD para su correcto plegamiento y actividad en la ME (González-Pedrajo and Dreyfus, 2003). Por otro lado, existe evidencia de que los dominios N-terminal: N0 que comprende los primeros 100 aminoácidos, N1 que está comprendido entre los aminoácidos 100 al 170, N2 comprendido entre los aminoácidos 170 al 240 y N3 ubicado del aminoácido 240 al 320 de la región N-terminal de GspD, interactúan con el dominio HR de GspC (región homóloga), formando un vestíbulo periplásmico (Figura 4 y Figura 6) (Korotkov, 2009; Korotkov *et al.*, 2011). Esta interacción es crítica para el funcionamiento y posiblemente para el ensamble del T2S (Reichow *et al.*, 2010); una o ambas proteínas o la interacción entre ellas también puede ser

importante para el reconocimiento de la exoproteína, la formación de la pseudopilina y para la secreción de la exoproteína a través del poro formado por GspD (Figura 6) (Korotkov *et al.*, 2011).

Alcaraz Sosa (2008) por inmunohistoquímica demostró que la secretina GspD es expresada durante la infección experimental con una cepa virulenta de *Leptospira* serovariedad Canicola en hámster, mientras que Rodríguez Reyes (2007), detectó anticuerpos IgG en el suero de animales infectados o sospechosos. En 2009, Núñez Carrera realizó un ensayo de inmunoprotección con rGspD de *Leptospira borgpetersenii* (Hardjobovis), en hámsteres desafiados con un aislado virulento (LOCaS46), de la serovariedad Canicola en el cual obtuvo una sobrevivencia del 80% de animales inmunizados con la proteína rGspD. Sin embargo, el grupo testigo mostró una sobrevivencia del 60%. Aunado a esto, Ordóñez López (2010), mostró que los genes que componen el locus *gsp* se encuentran altamente conservados entre las cepas Hond Utrecht IV (HU IV) y LOCaS46 (99-100% de homología). La secretina de la serovariedad Canicola GspD de estas dos cepas de *L. interrogans* al ser comparada con otras leptospiras patógenas mostró una alta homología (*L. interrogans* serovariedad Copenhageni 99%, *L. interrogans* serovariedad Lai 99%, *L. borgpetersenii* serovariedad Hardhobovis 92%), en tanto que al ser comparada con la serovariedad no patógena (*L. biflexa* serovariedad Patoc), esta homología disminuye considerablemente (62%), (Mena Bañuelos, 2006). Con base en el análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos que comprende GspD de LOCaS46, se determinaron dos regiones potencialmente inmunodominantes que se encuentran dentro de la porción amino de la proteína (ubicados entre los aminoácidos 95 al 141 y 156 al 193) y dos más que se localizan en la porción carboxilo de la proteína (ubicados entre los aminoácidos 405 al 462 y 505 al 569). Considerando lo mencionado por Reichow *et al.* (2010) y Korotkov *et al.* (2011), la región amino de

la proteína se encuentra formando un vestíbulo periplásmico al interactuar con GspC, en tanto que la región carboxilo de la proteína se encuentra formando el anillo dodecamérico de GspD en la ME.

Cuadro 2 Peso molecular de la secretina GspD de *E. coli* y otras proteínas homólogas.

Bacteria	Denominación	Número de aa.	Peso molecular (kDa)
<i>E. coli</i>	GspD	650	74.17
<i>Ps. aeruginosa</i> PAO1	XcpQ	658	69.95
<i>L. interrogans</i> sv* Lai	GspD	615	68.71
<i>L. interrogans</i> sv* Copenhageni	GspD	596	66.46
<i>L. borgpetersenii</i> sv* Hardjo	GspD	598	66.70

*sv= serovariedad

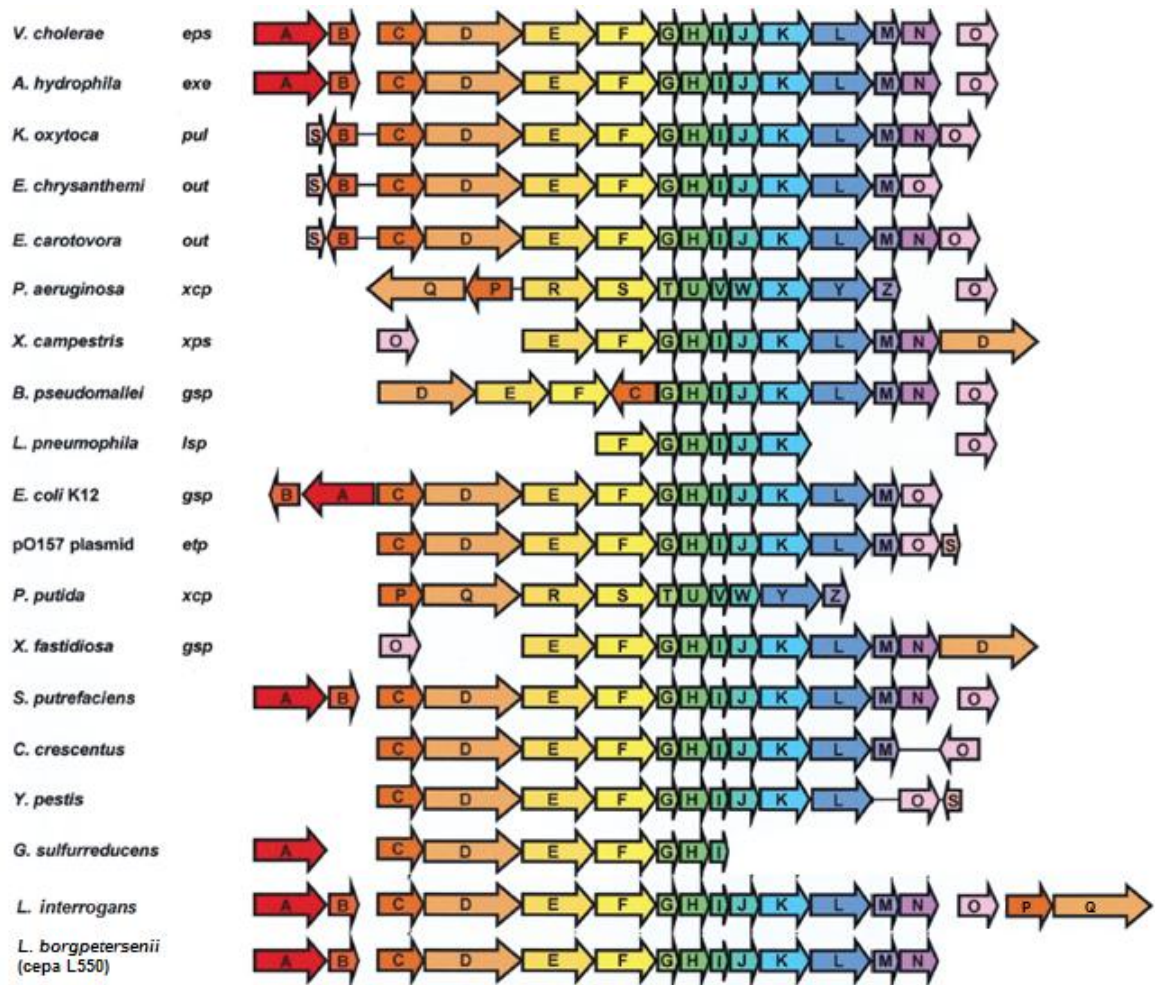


Figura 3. Esquematzación del operón del T2S

Puede observarse la diferencia en la nomenclatura de los genes que codifican para este sistema en diferentes especies bacterianas y la variación en la cantidad de genes involucrados en cada T2S. En *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis) cepa L550 este sistema está comprendido por 14 genes mientras que en *L. interrogans* consta de 17 genes (Modificado de Sandkvist, 2001; Rodríguez Reyes, 2007; Ordoñez López, 2010).

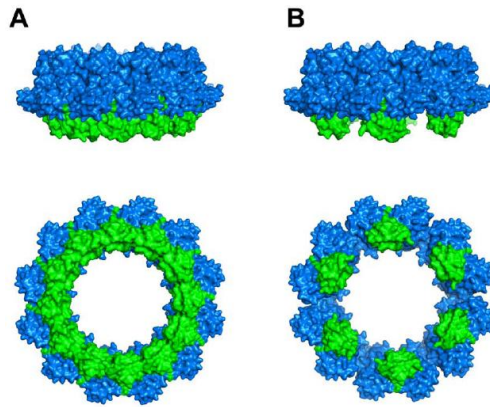


Figura 4. Interacción de unidades proteicas de GspC y GspD

Dos vistas perpendiculares del anillo dodecamérico de GspD (azul), obtenido de estudios de cristalografía y microscopía electrónica, (A) interacción de las regiones amino (N0, N1) de GspD con las regiones HR de un anillo dodecamerico de GspC (verde); (B) interacción de las regiones amino (N0, N1) de GspD con las regiones HR de un anillo de seis unidades de GspC (verde) (Korotkov *et al.*, 2011).

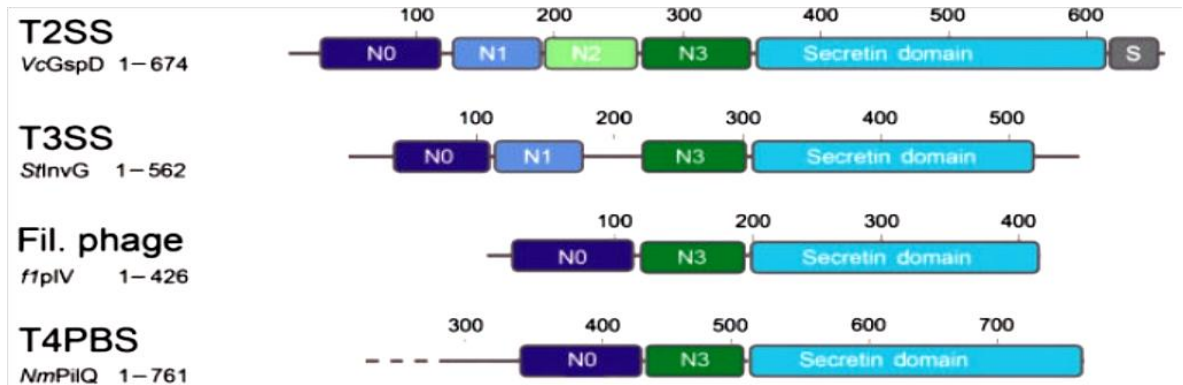


Figura 5. Comparación entre la arquitectura de las secretinas de diferentes sistemas de secreción

Esquematación de la arquitectura de los dominios de las secretinas de T2S, T3S, sistema de ensamble del fago filamentoso y el sistema de biogénesis del pili T4. N0, N1, N2, N3 hace referencia a los dominios que se encuentran en la porción amino de la proteína (Reichow *et al.*, 2010).

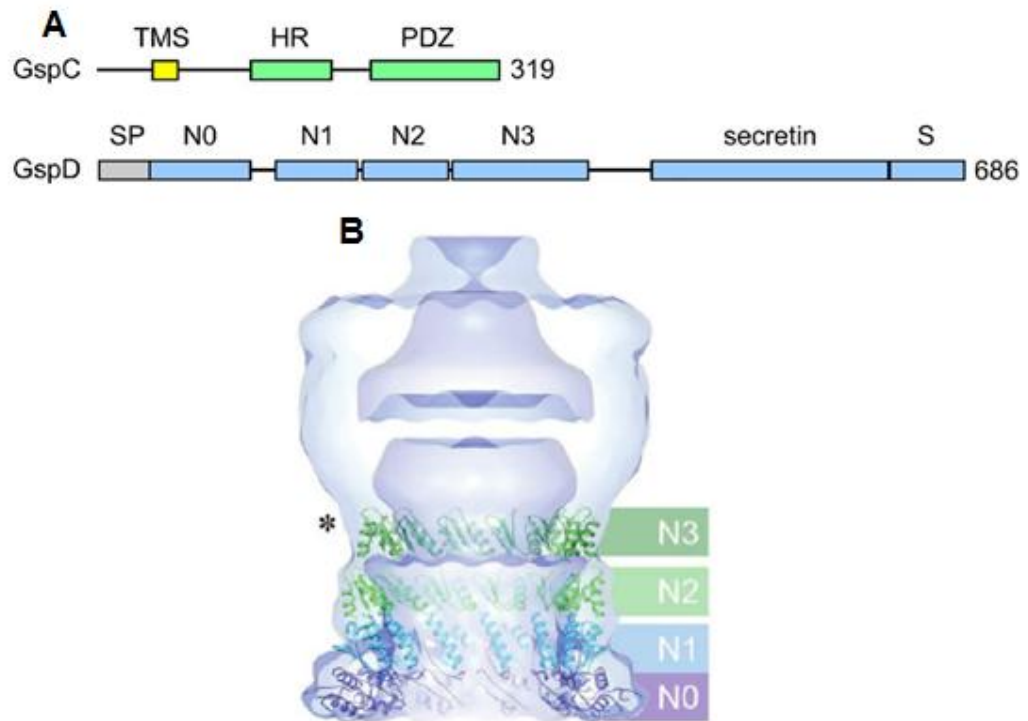


Figura 6. Dominios de GspC y GspD que interactúan en el periplasma

(A) Esquema de la estructura de los dominios de GspC y GspD, TMS: Segmento transmembranal, HR: Dominio de la Región Homóloga, PDZ: Dominio PDZ de unión; SP: Péptido señal (Korotkov *et al.*, 2011). (B) Modelo de la conexión de los doce miembros del anillo de VcGspD y sus dominios N-terminal (N0, N1, N2, N3), formando el vestibulo periplásmico (Reichow *et al.*, 2010).

Sistema pET para la expresión de proteínas recombinantes

Los sistemas de expresión están diseñados para producir muchas copias de una proteína dentro de una célula huésped. Estos vectores deben contener toda la codificación genética necesaria para expresar la proteína, incluyendo un promotor apropiado a la célula huésped, una secuencia que termine la transcripción y una secuencia que codifique para un sitio de unión al ribosoma. En 1986 Studier y Moffatt desarrollaron un sistema de expresión de la ARN polimerasa, que fue altamente selectiva para el T7 ARN polimerasa. El sistema inicial involucró dos diferentes métodos para el mantenimiento de la T7 ARN polimerasa dentro de la célula, en un método, un bacteriófago lambda fue usado para insertar el gen que codifica para la T7 ARN polimerasa, y en el otro método, el gen para la T7 ARN polimerasa fue insertado dentro del cromosoma del huésped. Este sistema es el que ahora conocemos como el sistema pET de expresión, en este sistema la región promotora T7 es reconocida por la T7 ARN polimerasa de las células empleadas para la expresión (lisógenos DE3), estas células poseen en su cromosoma el gen que codifica para la T7 ARN polimerasa y se expresa mediante inducción con IPTG, lo que garantiza la transcripción y posterior traducción del gen de interés (Figura 7). En condiciones optimas, la proteína recombinante expresada representa más del 50% de las proteínas totales de la célula en unas cuantas horas post-inducción (Novagen®).

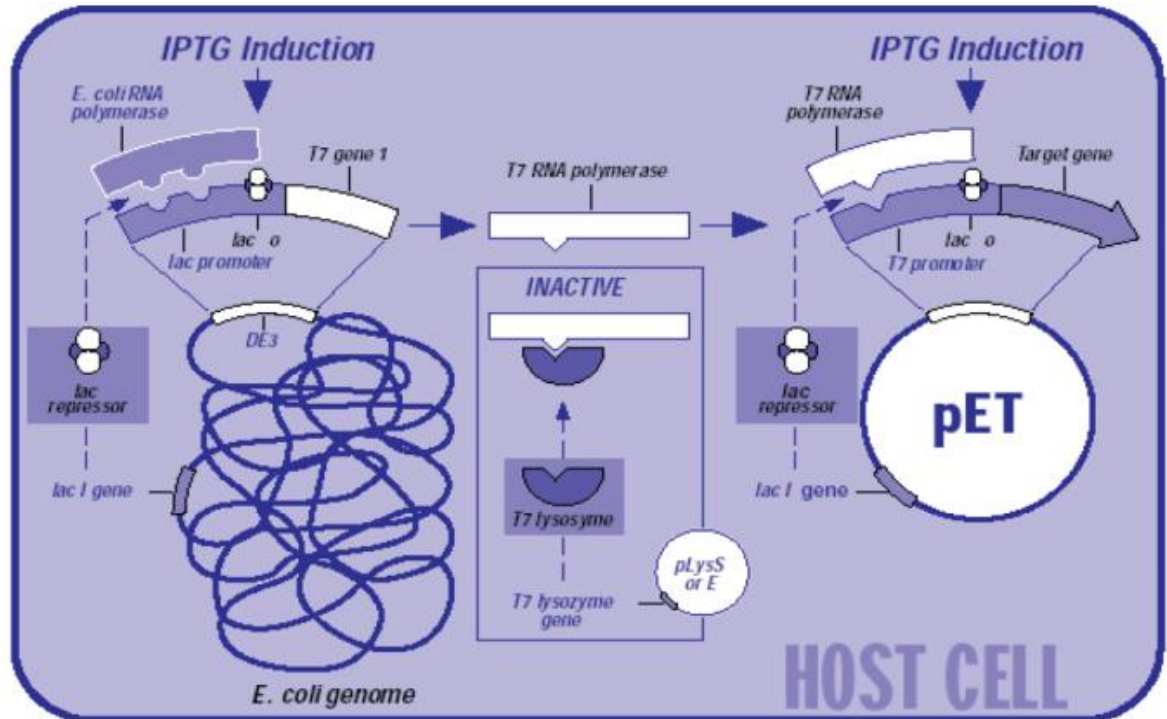


Figura 7. Sistema pET de expresión

IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido) es un inductor de la expresión del promotor de la lactosa, en su presencia, se activa la expresión de la T7 ARN polimerasa en las *E. coli* DE3 y permite que esta polimerasa exprese el gen de interés en el sistema pET.

Objetivos.

Objetivo general

- Clonación, expresión y análisis bioinformático de GspD de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46.

Objetivos específicos

- Amplificar el gen *gspD* que codifica para la secretina GspD del T2S de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola (cepa LOCaS46).
- Clonar y expresar en *E. coli* el gen *gspD* de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola (cepa LOCaS46).
- Purificar la proteína recombinante rGspD_L de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola (cepa LOCaS46).
- Identificar las regiones que contienen los epítopes de GspD mediante su análisis bioinformático.

Hipótesis.

GspD de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 posee epítopes B lineales expuestos en la ME.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Extracción de ADN.

Un cultivo de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 en medio Ellinghausen modificado por Johnson y Harris (EMJH), de aproximadamente 7 días de incubación se centrifugó a 10,500 X g durante 10 min (*Centrifuge 5418 Eppendorf*). Una vez centrifugado, se descartó el sobrenadante y la pastilla bacteriana se resuspendió en 275 µl de la solución de lisis (tiocianato de guanidina 5 M, EDTA 0.1 M, Sarcosil 0.5% P/V), usando un homogenizador oscilatorio de alta velocidad durante un minuto (*Vortex, Termolyne, Maxi-Mix Plus*). Se agregaron 125 µl de Acetato de Amonio 7.4 M y se mezcló invirtiendo el tubo de 5 a 10 veces, se incubó en hielo durante 10 min. Posteriormente, se agregaron 250 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (25:1) y se mezcló usando un homogenizador oscilatorio de alta velocidad durante un minuto. La mezcla se centrifugó a 14,500 X g durante 5 min, el sobrenadante se recuperó y repitió el lavado con 250 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (25:1). La mezcla nuevamente fue centrifugada con las mismas condiciones, el sobrenadante se recuperó y con la finalidad de precipitar el ADN se agregaron 750 µl de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión hasta lograr la precipitación del ADN. Se centrifugó nuevamente y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se lavó el ADN con 1 ml de etanol 70% y se centrifugó, se eliminó el sobrenadante, la pastilla se secó a temperatura ambiente (T.A.) y finalmente se reconstituyó en 100 µl de agua desionizada estéril y se incubó a 65°C durante 30 min, el ADN se conservó en congelación (Boom *et al.*, 1990).

Cepas utilizadas

Para lograr la replicación del vector de clonación (Vector T), se utilizó *E. coli* DH5 α , la cual es sensible a antibióticos como ampicilina, cloramfenicol y kanamicina. Para lograr la expresión de la proteína se emplearon lisógenos DE3, esta designación se refiere a que la cepa de *E. coli* posee como lisógeno al fago λ DE3, el cual porta el gen que codifica para la T7 ARN polimerasa, este gen se encuentra bajo el control del promotor *lacUV5* permitiendo cierto grado de transcripción en el estado no inducido; se requiere isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG), para lograr la inducción de la T7 ARN polimerasa en altos niveles. Las cepas empleadas para la expresión de la proteína recombinante fueron: *E. coli* BL21 DE3 y *E. coli* Rosetta DE3 codon plus, esta última posee como característica principal la capacidad de sintetizar ARNt's para codones que otras cepas de *E. coli* no poseen (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA), es resistente a cloranfenicol debido al gen que codifica para la acetil transferasa del cloranfenicol (*Cam*) presente en el plásmido pRARE que codifica para los diferentes ARNt's (Figura 8).

Vector T

El vector T empleado en este estudio correspondió a un kit comercial (InsTAclone™ PCR Cloning Kit), este sistema fue empleado para lograr la clonación del producto de PCR (*gspD*) a partir de ADN genómico de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46, el plásmido empleado en este sistema corresponde al vector pTZ57R/T (Figura 9), en el cual pueden emplearse los iniciadores universales M13 que flanquean el sitio de clonación. El vector se encuentra linearizado y en el extremo 3' posee una cola de Timina (T), esta cola de T previene la recircularización del vector y facilita la clonación del producto de PCR al interactuar con la cola de Adenina (A), que agrega la *Taq* ADN polimerasa en el extremo 3' a los productos de PCR.

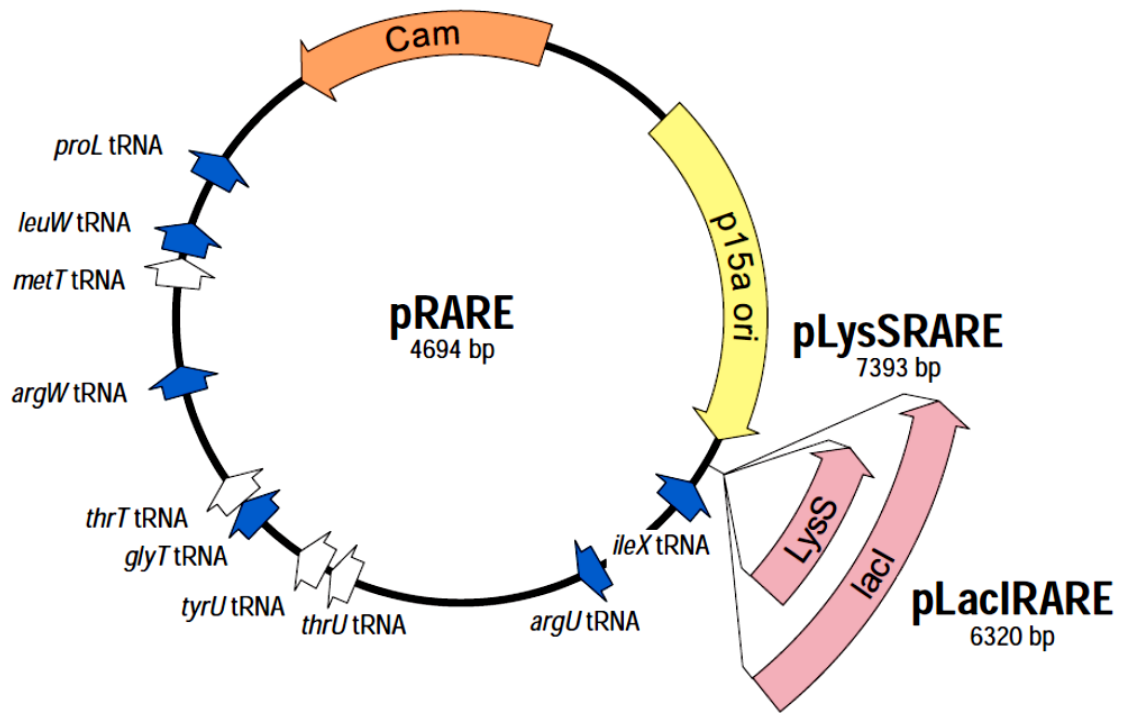


Figura 8. Mapa del plásmido pRARE

En el esquema se indica la ubicación del gen de la resistencia al cloranfenicol (Cam), origen de la replicación (p15a ori) y los genes para los ARNt que corresponden a los codones raros en *E. coli* son indicados en azul (Novy *et al.*, 2001).

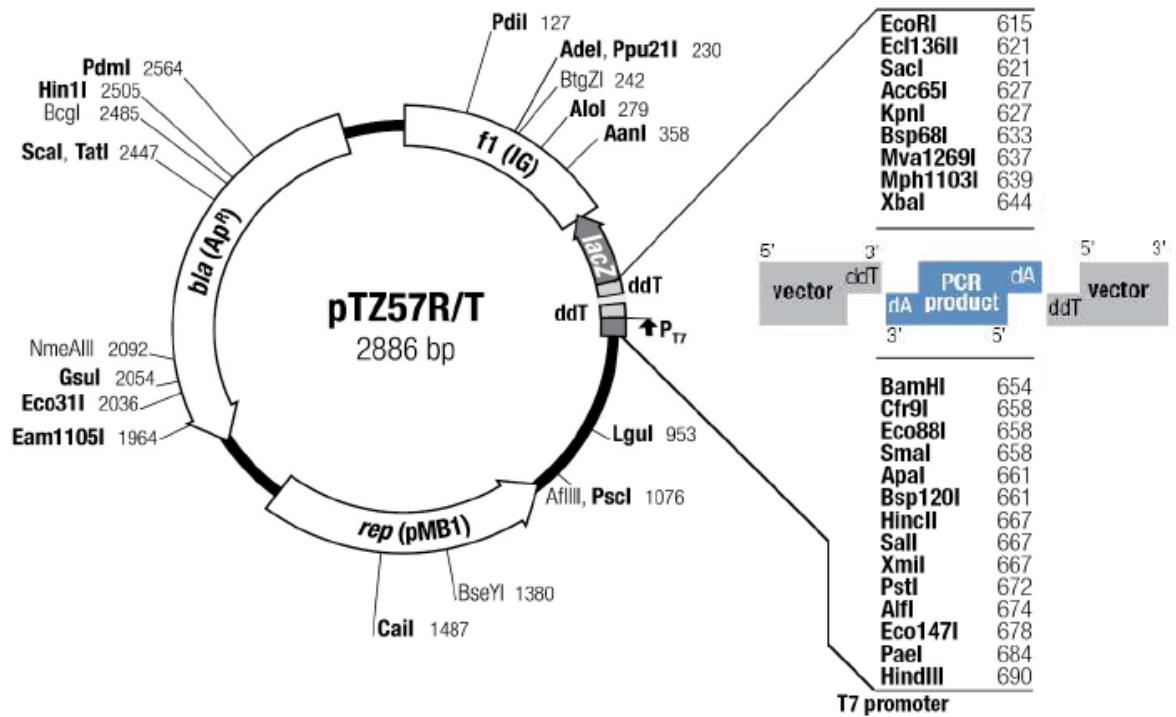


Figura 9. Mapa del Vector T (pTZ57R/T)

Vector de 2,886 pb con un gen de β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina, el sitio de clonación se encuentra dentro de una región que codifica para un α -péptido de la enzima β -galactosidasa (*lacZ*), la región *rep* (pMB1) es un replicón del plásmido pMB1 responsable de la replicación, posee un promotor T7 para la transcripción del inserto.

pET11a

En este estudio se utilizó el vector de expresión pET11a, el cual permite la clonación y expresión de proteínas recombinantes, este sistema posee el promotor y terminador T7 aledaños al sitio múltiple de clonación (indicado por la enzima de restricción *Bam*HI), para facilitar la expresión de la proteína y al mismo tiempo regular la expresión con la ayuda de una secuencia que codifica para el represor del operón de la lactosa (Figura 10). Para efectos de este estudio, pET11a fue linearizado con las enzimas de restricción *Nde*I y *Bam*HI.

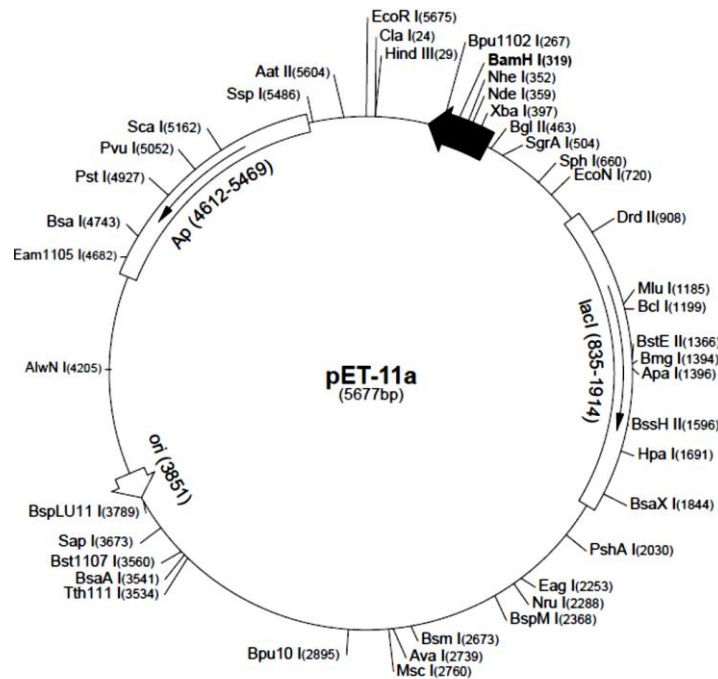


Figura 10. Vector pET11a

Vector pET11a de 5,677 pb, como características tiene un promotor T7 (432-448), una secuencia que codifica para una etiqueta T7 (328-360), posee una secuencia que codifica para β -lactamasa la cual confiere resistencia a ampicilina; además posee una secuencia que codifica para el represor del operón de la lactosa (835-1914), el sitio de origen de la replicación en este vector se encuentra en la posición 3,851 y el sitio múltiple de clonación está indicado por la enzima de restricción *Bam*HI.

Preparación de bacterias competentes con CaCl₂

Se inoculó medio líquido LB sin antibióticos (20 ml), con *E. coli* DH5α o BL21 y con *E. coli* Rosetta DE3 se inoculó LB con cloranfenicol (34 µg/ml). Se incubó a 37°C con agitación orbital a 200 rpm durante 16 hrs, el cultivo fue diluido con una relación 1:50 en medio LB sin antibióticos o con cloranfenicol según el caso (10 ml de cultivo de 16 hrs + 490 ml de medio líquido LB) y se incubó a 37°C con agitación orbital a 200 rpm hasta que el cultivo alcanzó un valor de absorbancia de 0.7 a una longitud de onda de 600 nm. Al término de la incubación, el matraz se colocó en hielo (es importante que la base del matraz sea cubierta por el hielo) y a partir de este momento las bacterias se mantuvieron en hielo en todo momento, ya que si se rompe la cadena fría, se altera la calidad del lote de bacterias competentes.

El cultivo se centrifugó a 4,500 X g durante 10 min a 4°C (*Centrífuga refrigerada Jouan MR 18.12*). Se decantó el sobrenadante y la pastilla de bacterias fue colocada inmediatamente en hielo para ser resuspendida con 0.2 volúmenes de una solución 50 mM de CaCl₂ (estéril). La pastilla de bacterias se disuelve mejor usando una pipeta de vidrio (aspirando y expulsando), de lo contrario quedarán grumos con bacterias compactadas, las cuales no podrán modificar sus cargas por la acción del calcio.

El cultivo se mantuvo en hielo durante 3 hrs, las bacterias se centrifugaron como anteriormente, el sobrenadante fue eliminado y la pastilla de bacterias colocada inmediatamente en hielo para ser resuspendida con pipeta Pasteur con 0.2 volúmenes de una solución 50 mM de CaCl₂ (100 ml) y se centrifugó nuevamente y decantó el sobrenadante, finalmente se resuspendió la pastilla de bacterias en 2 ml de CaCl₂ 50 mM adicionado con 15% de glicerol estéril.

Se colocaron 100 µl de bacterias competentes en tubos de 1.5 ml estériles y fríos, los cuales al recibir la mezcla de bacterias se mantuvieron en hielo. Una vez preparadas todas las réplicas, se conservaron a -70°C hasta su uso. Es recomendable realizar la evaluación de la eficiencia en el estado competente de las células, para ello se transformaron con una concentración conocida de un plásmido no linearizado, una vez obtenidas las colonias recombinantes se procede a realizar una cuenta total de estas, el resultado debe expresarse con base en la cantidad de células recombinantes que pueden obtenerse al agregar 1 µg de ADN de plásmido. Para considerar como eficiente un estado competente de las células, el resultado de su evaluación debe ser $\geq 1 \times 10^6$ transformantes por 1 µg de plásmido.

Clonación del gen *gspD* en el Vector T.

Amplificación de *gspD*

Se amplificó el gen codificante de la proteína GspD (1,791 pb), a partir de ADN genómico de la cepa virulenta LOCaS46 de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola, mediante la técnica de PCR en un volumen de 50 µl, para lo cual se empleó el iniciador adelantado (P11F, Cuadro 17), diseñado con un sitio de corte para la enzima de restricción *NdeI* (CA_TATG) y el iniciador reverso (P11R, Cuadro 17), diseñado con un sitio de corte para la enzima *BamHI* (G_GATCC), estos sitios de restricción fueron elegidos debido a que el plásmido pET11a comprende los sitios de restricción antes mencionados. Las secuencias de estos iniciadores se encuentran en el Cuadro 17 (Apéndice 2), la reacción de la PCR se realizó bajo las condiciones indicadas en el Cuadro 3 y el proceso de termociclado se esquematiza en la Figura 11. Se comprobó la correcta amplificación del gen mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (5 µg/ml).

Cuadro 3 Condiciones de la PCR para la amplificación de *gspD* con los iniciadores P11F+R

Reactivo	[Inicial]	[Final]	Cantidad en μ l
DNTP's	2 mM	0.2 mM	5
P11 F + R	10 mM	0.3 mM	1.5
Buffer	10X	1X	5
MgCl ₂	30 mM	1.5 mM	2.5
Taq. Pol.	5 U/ μ l	2 U/ μ l	0.5
ADN	----	3 μ l/Rx*	3
H ₂ O	----	Cbp** 50 μ l	32.5
TOTAL			50 μ l

*Rx: Reacción **Cbp: Cuanto baste para

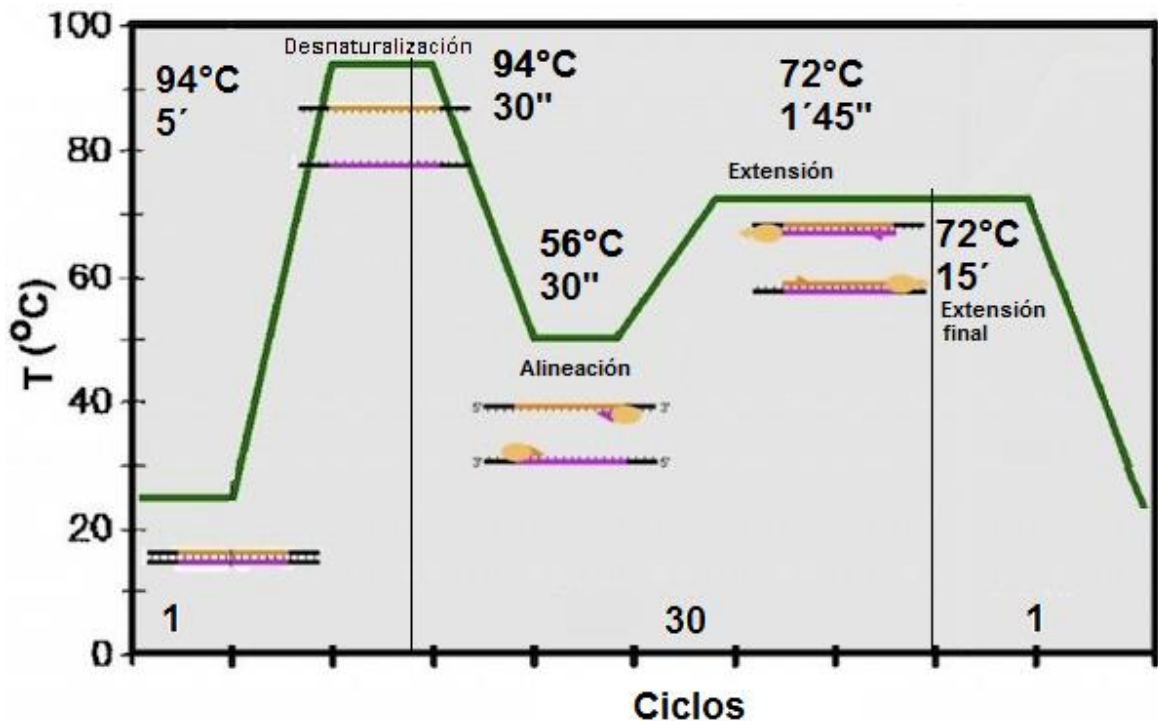


Figura 11. Termociclado para la amplificación de *gspD* con iniciadores P11F+R, pET11aF+R ó M13F+R.

La PCR comienza con una desnaturalización inicial del ADN a 94°C durante 5 min, posterior a esto comienzan 30 ciclos constituidos por tres fases cada ciclo: una fase de desnaturalización del ADN a 94°C durante 30 seg, seguido por una fase de alineación de los iniciadores (P11F+R, pET11aF+R o M13F+R, según el caso) a 56°C durante 30 seg, después de la alineación el ciclo termina con una fase de extensión a 72°C durante 1 min con 45 seg. Una vez culminados los 30 ciclos la reacción de la PCR finaliza con una etapa de extensión final a 72°C durante 15 min, esta última etapa es indispensable para que en cada amplificado se agregue una cola de A (Adenina), la cual es la que permitirá que el inserto pueda introducirse en el Vector T. Cuando se realiza la PCR con la finalidad de hacer el escrutinio de las colonias recombinantes, la extensión final se realizó a 72°C durante 7 min. Es importante mencionar que con los tres juegos de iniciadores se logró la amplificación a la misma temperatura de alineación (56°C).

Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Una vez comprobada la amplificación de *gspD* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, se recortó la banda de interés empleando un transiluminador (*Benchtop UV Transilluminator MultiDoc-It*) y una hoja de bisturí, el fragmento recortado fue pesado y colocado en un tubo de 1.5 ml (*Balanza ADAM AFP-2100LC*). Se agregaron tres volúmenes de Yoduro de Sodio 6 M (NaI 6 M), tomando en cuenta que 1 g del gel de agarosa equivale a 1 ml (un volumen). Se incubó de 5 a 10 min a 55°C hasta que la agarosa se disolvió por completo e inmediatamente se agregaron 1.5 mg de perlas de sílice y se incubó la mezcla mínimo durante 30 min a 4°C. La mezcla fue centrifugada a 16,000 X g durante 4 min a 4°C (*Centrifuga Allegra™ 25R*), el sobrenadante fue decantado y la pastilla resuspendida con 500 µl de solución de lavado (NaCl 50mM, Tris-HCl pH7.5 10mM, EDTA 2.5mM, etanol 50% v/v), nuevamente se centrifugó bajo las mismas condiciones y se repitió el proceso de lavado, después de la centrifugación se eliminó el sobrenadante y la pastilla se secó por calor a 65°C aproximadamente durante 10 minutos (*Multi-Blok LAB-LINE*). La pastilla se resuspendió en 30 µl de agua destilada y esterilizada (D.E.) y se incubó a 55°C durante 5 min, después fue sometida a centrifugación durante 4 min a 16,000 X g a T.A. Se recuperó el sobrenadante en un tubo de 1.5 ml teniendo la precaución de no llevarse las perlas, la purificación fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (5 µg/ml).

Reacción de ligación y transformación.

Para la reacción de ligación se hizo una mezcla en la que se incluyó *gspD* amplificado por PCR y el Vector T en una relación 3:1, la enzima T4 ADN ligasa, buffer de ligación y agua (Cuadro 4), la mezcla se incubó durante toda la noche a 4°C. Posterior a la incubación de la ligación, se procedió a transformar por choque térmico 100 µl de células DH5α competentes con 10 µl de la reacción de ligación, una vez hecha la mezcla, esta fue incubada durante 30 min en hielo, inmediatamente se realizó el choque térmico a 42°C durante 1 minuto seguido de 2 min de incubación en hielo, al culminar la incubación se agregaron 900 µl de medio Luria Bertani (LB) sin antibióticos a las células transformadas. Se incubó durante 1 hora a 37°C para promover la recuperación de las células. Se centrifugó a 1,300 X g durante 6 min, se tomaron 100 µl de sobrenadante y se decantó el resto. Con los 100 µl tomados al principio se resuspendió la pastilla bacteriana para posteriormente inocular una placa de LB ampicilina, IPTG y X-Gal (100 µg/ml, 260 µg/ml y 80 µg/ml respectivamente) y se incubó a 37°C durante toda la noche.

Escrutinio para colonias recombinantes (*gspD* / Vector T)

Se seleccionaron las colonias blancas que desarrollaron en LB ampicilina, IPTG y XGal (100 µg/ml, 260 µg/ml y 80 µg/ml respectivamente) después de la incubación a 37°C durante toda la noche. Ya que el Vector T empleado para la clonación del inserto tiene como característica una región T7 y SP6 ARN polimerasa que flanquea el sitio de clonación que se encuentra dentro de una región que codifica para un α-péptido de la enzima β-galactosidasa (Figura 8). La inactivación del α-péptido por el inserto permite la identificación de recombinantes teniendo como indicador colonias blancas, las colonias azules corresponden a las que no contienen el inserto y mantienen activa la región que codifica para el α-péptido que hidroliza el X-Gal generando el color azul en la colonia. Las colonias blancas seleccionadas fueron colectadas con una punta; Se sembraron en placas

de LB ampicilina (100 µg/ml), procurando conservar una porción de la colonia en la punta ya que después el resto de la colonia que conservó la punta fue resuspendida en 25 µl de Agua D.E. con la finalidad de obtener ADN al lisar las células sometiéndolas a 94°C durante 10 min. Con el ADN obtenido se hizo una PCR con los iniciadores universales M13 adelantado y reverso que flanquean el sitio de clonación en el vector T (Cuadro 17, Apéndice 2). La reacción de la PCR de escrutinio se realizó bajo las condiciones indicadas en el Cuadro 5 y el proceso de termociclado se esquematiza en la Figura 11. Las colonias que resultaron positivas a la PCR mostrando un amplificado del peso esperado (inserto + vector= 1,975 pb), fueron nuevamente evaluadas por PCR empleando iniciadores específicos para *gspD* (P11F+R); la reacción de la PCR de escrutinio con los iniciadores específicos para *gspD* se encuentra en el Cuadro 6 y el proceso de termociclado se esquematiza en la Figura 11; el escrutinio con iniciadores P11F+R se realizó bajo las mismas condiciones tanto para la evaluación de las clonas obtenidas con el Vector T como para las clonas obtenidas con pET11a.

A las colonias positivas a las dos pruebas de PCR se les extrajeron el plásmido mediante la técnica descrita más adelante en extracción de ADN de plásmido (pág. 36). El plásmido extraído fue digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* que actúan sobre los sitios de restricción incluidos en los iniciadores P11 F y R (Cuadro 17, Apéndice 2). Una vez preparada la reacción de la digestión (Cuadro 7), se incubó a 37°C durante 72 hrs; la finalidad de la digestión es comprobar que el inserto es del peso esperado y prepararlo para que esté en fase para su posterior clonación y expresión en pET11a, para ello, se comprobó la digestión y observó el peso del inserto en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (5 µg/ml). Es preciso mencionar que en esta electroforesis se cargó toda la reacción de la digestión con la finalidad de purificar

el inserto digerido (*gspD*) mediante la técnica de purificación de ADN a partir de geles de agarosa descrita anteriormente.

Cuadro 4 Reacción de ligación de *gspD* con el Vector T

Reactivo	[Inicial]	[Final]	Cantidad en μl
Vector T	55 ng/ μl	110 ng	2
<i>gspD</i>	33 ng/ μl	330 ng	10
T4 ADN lig.	5 U/ μl	5 U	1
Buffer	10X	1X	4
Agua	-----	Cbp** 20 μl	3
TOTAL			20 μl

**Cbp: Cuanto baste para

Cuadro 5 Condiciones de la PCR de escrutinio para la evaluación de la inserción de *gspD* en el Vector T con los iniciadores M13F+R

Reactivo	[Inicial]	[Final]	Cantidad en μl
DNTP's	2 mM	0.2 mM	2
M13 F + R	10 mM	0.2 mM	0.4
Buffer	10X	1 X	2
MgCl ₂	30 mM	1.5 mM	1
Taq. Pol.	5 U/ μl	1 U/Rx*	0.2
ADN	----	5 μl /Rx*	5
H ₂ O	----	Cbp** 20 μl	9.4
TOTAL			20 μl

*Rx: Reacción **Cbp: Cuanto baste para

Cuadro 6 Condiciones de la PCR de escrutinio para la evaluación de la inserción de *gspD* en el Vector T y en pET11a con los iniciadores P11F+R

Reactivo	[Inicial]	[Final]	Cantidad en μ l
DNTP's	2 mM	0.2 mM	2
P11 F + R	10 mM	0.3 mM	0.6
Buffer	10X	1X	2
MgCl ₂	30 mM	1.5 mM	1
Taq. Pol.	5 U/ μ l	2 U/Rx*	0.4
ADN	----	5 μ l/Rx*	5
H ₂ O	----	Cbp** 20 μ l	9
TOTAL			20 μ l

*Rx: Reacción **Cbp: Cuanto baste para

Cuadro 7 Reacción de digestión.

Reactivo	[Inicial]	[Final]	Cantidad en μ l
Plásmido	----	30 μ l/Rx*	30
Buffer	10X	1X	10
<i>Bam</i> HI	10 U/ μ l	20 U	2
<i>Nde</i> I	20 U/ μ l	40 U	2
H ₂ O	----	Cbp** 100 μ l	56
TOTAL			100 μ l

*Rx: Reacción **Cbp: Cuanto baste para

Extracción de ADN de plásmido

En tubo tipo Falcon de 15 ml estéril con 10 ml de LB con ampicilina 100 mg/ml, se cultivó la colonia seleccionada a partir del escrutinio, el medio fue incubado en agitación a 37°C durante toda la noche. Posterior a la incubación y en condiciones de esterilidad, se colectó 1 ml del cultivo para conservar la colonia en LB ampicilina (50 mg/ml) o con el antibiótico correspondiente más 16% de glicerol, los 9 ml de cultivo restantes se sometieron a centrifugación a 1,300 X g por 8 min, el sobrenadante fue decantado y la pastilla de bacterias resuspendida en 600 µl de solución de lisis (Sacarosa 8%, Tritón X-100 5%, EDTA 50 mM, Tris pH 8 50 mM) y se transfirió a un tubo tipo Eppendorf de 1.5 ml, se incubó durante 10 min a T.A. Se adicionaron 1.25 µg/µl de lisozima y se incubó durante 10 min a T.A. Al finalizar, se incubó a ebullición por un minuto, se centrifugó a 16,000 X g durante 10 min, el sobrenadante fue recuperado y se trató con ARNasa a una concentración final de 15 µg/ml y se incubó a 37°C por una hora, se agregó Proteinasa K a una concentración final de 50 µg/ml y se incubó a 50°C durante una hora, las enzimas fueron inactivadas a 65°C durante 30 min y el ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto frío o un volumen de isopropanol. Se incubó durante 30 min a -20°C. Se centrifugó a 22,000 X g durante 10 min y se decantó el sobrenadante, la pastilla fue lavada en dos ocasiones con 300 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 11,200 X g durante 5 min, el sobrenadante fue decantado y al finalizar los 2 lavados la pastilla se secó por calor para después ser resuspendida en 100 µl de agua D.E. y se conservó a -20°C; se comprobó la extracción del plásmido en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (5 µg/ml).

Clonación del gen *gspD* en pET11a.

Con la finalidad de asegurar que el fragmento amplificado (*gspD_L*) se encuentra en fase para su clonación y expresión en pET11a, se realizó su digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI – *Nde*I (Cuadro 7) a 37°C durante 72 hrs; pET11a fue previamente linearizado con las mismas enzimas de restricción. Después del análisis y purificación de los fragmentos digeridos mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (5 µg/ml), con una reacción de ligación empleando la enzima T4 ligasa, el gen fue colocado en el plásmido pET11a en una reacción 3:1 (inserto:vector), para que de esta manera pudiera ser clonado y expresado en sistemas heterólogos (*E. coli* DH5α [*Invitrogene*] y *E. coli* BL21 y Rosetta DE3 codon plus [*Novagene*], respectivamente), la reacción de ligación se describe en el Cuadro 8. La mezcla se incubó durante toda la noche a 4°C.

Se tomaron 30 ng de pET11a, lo cual correspondió a 6 µl de la reacción de ligación, para transformar 100 µl de células DH5α CaCl₂. La mezcla se incubó durante 30 min en hielo, 1 minuto a 42°C y 2 min en hielo nuevamente, terminando este periodo de incubación, inmediatamente se les agregaron 900 µl de LB sin antibióticos a las células transformadas. Se incubó durante 1 hora a 37°C para promover la recuperación de las células, una vez recuperadas las células, se tomaron 100 µl para inocular una placa de LB ampicilina (100 µg/ml), ésta fue incubada a 37°C durante toda la noche.

Escrutinio de las colonias recombinantes obtenidas

Se seleccionaron las colonias que desarrollaron en el agar LB ampicilina (100 µg/ml), las colonias seleccionadas fueron colectadas con una punta. Se sembraron en placas nuevas de LB ampicilina (100 µg/ml) procurando conservar una porción de la colonia en la punta, el resto de la colonia que conservó la punta

fue resuspendida en 25 μ l de agua D.E. con la finalidad de obtener ADN al lisar las células sometiéndolas a 94°C durante 10 min. Con el ADN obtenido se hizo una PCR con los iniciadores P11F+R que son específicos para *gspD* (Cuadro 17, Apéndice 2). La reacción de la PCR de escrutinio se realizó bajo las condiciones indicadas en el Cuadro 6 y el proceso de termociclado se esquematiza en la Figura 11.

A las colonias que resultaron positivas a la PCR se les extrajo el plásmido mediante la técnica descrita en el tema extracción de ADN de plásmido (pág. 36). Una vez comprobada la extracción del plásmido, este fue digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* que actúan sobre los sitios de restricción incluidos en los iniciadores P11 F y R (Cuadro 17, Apéndice 2). La reacción de la digestión se encuentra en el Cuadro 7, una vez preparada la reacción se incubó a 37°C durante 48 horas; la finalidad de la digestión es comprobar la presencia del inserto de longitud esperada. Se comprobó la digestión y corroboró la longitud del inserto en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (5 μ g/ml) y marcador de longitud λ *BstEII*. Una vez comprobado que las colonias seleccionadas fueron positivas a la PCR y al ensayo de digestión, el plásmido obtenido de estas se empleó para hacer una transformación en células de *E. coli* BL21 DE3 y *E. coli* Rosetta DE3 codon plus [*Novagene*]. Las colonias recombinantes de ambas cepas fueron sometidas a escrutinio mediante PCR (Cuadro 6, Figura 11). Las colonias 15 y 21 de BL21 y la colonia 15 de Rosetta DE3, todas positivas al escrutinio, fueron candidatas para el ensayo de expresión de la proteína.

Expresión y evaluación de la antigenicidad de rGspD mediante sistemas de inmunotransferencia Western.

Las colonias de *E. coli* BL21 DE3 y *E. coli* Rosetta DE3 codon plus [Novogene] recombinantes, fueron cultivadas en 5 ml de caldo LB con ampicilina (100 µg/ml) o LB ampicilina (100 µg/ml) más cloranfenicol (35 µg/ml) respectivamente, a 37°C a 200 X g en agitación orbital durante toda la noche. Posteriormente, se realizó la expansión del cultivo empleando 100 µl para inocular por cada 25 ml de cultivo para inducir. Después de la inoculación se incubó nuevamente a 37°C a 200 rpm en agitación orbital hasta que alcanzaron un valor de absorbancia de 0.6 a una longitud de onda de 600 nm. En este momento se indujo con IPTG 1mM, ya que el promotor de la T7 ARN de las cepas *E. coli* BL21 y Rosetta DE3 codon plus [Novogene] se encuentra regulado por el producto de expresión del gen *lacI*. Después de agregar el IPTG se monitoreó el desarrollo bacteriano midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm a las horas 1, 4 y 7 post-inducción y del cultivo incubado toda la noche. Las muestras fueron colectadas por duplicado, una fue empleada para medir la absorbancia y la otra para realizar diluciones y hacer siembras en agar LB con antibióticos correspondientes, esto con la finalidad de realizar la cuenta total bacteriana (los datos no se muestran) y evaluar si la proteína recombinante tiene algún efecto tóxico sobre las bacterias; además, estas muestras se emplearon para hacer extracción de ARN y evaluar mediante RT-PCR la transcripción del gen de interés.

Por otro lado, las muestras empleadas para medir la absorbancia fueron sometidas a centrifugación a 2,200 X g durante 8 min para formar una pastilla bacteriana y eliminar el medio de cultivo. Se lavó una vez la pastilla bacteriana con agua inyectable y finalmente se reconstituyó en 100 µl de agua inyectable, los cuales fueron colocados en un tubo para PCR por muestra y se les agregaron 20

µl de buffer de carga 5X para proteínas (0.5 M Tris-HCl pH6.8, Glicerol, SDS 10%, 2-Mercaptoethanol, azul de bromofenol 0.5%, en agua destilada). Las muestras fueron desnaturalizadas a 94°C durante 10 min usando un termociclador para la obtención de las proteínas totales. Posterior a la desnaturalización, se realizó electroforesis de las proteínas totales en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (10% gel separador y 4% gel concentrador), el voltaje empleado fue de 88 V para el gel concentrador y 130 V para el gel separador. Después de esto, el gel fue teñido durante toda la noche con azul de Coomassie (50% metanol absoluto, 10% ácido acético, 50% agua destilada y 0.055% azul de Coomasie). Después, se decoloró el gel con solución decolorante de Coomassie (40% metanol absoluto, 10% ácido acético, 60% agua destilada) hasta que las bandas fueron visibles, el gel se lavó con agua destilada. Para finalizar, el gel se secó en un bastidor con papel celofán dulce para su conservación. Posterior a la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, se seleccionaron las muestras correspondientes a las horas 1 y 7 y del cultivo incubado durante toda la noche para ser transferidas. Las muestras seleccionadas fueron sometidas a electroforesis bajo las mismas condiciones y se transfirieron a una membrana de PVDF (Immuno-Blot® Bio-Rad) usando una cámara de transferencia semiseca. Para la detección de rGspD, se realizó inmunodetección tipo Western utilizando sueros inmunes específicos anti GspD de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis) y anti Canicola producidos en conejos obtenidos en un estudio anterior (Rodríguez Reyes, 2007) y sueros de animales positivos contra *Leptospira*.

Determinación de la transcripción de *gspD*

Para evaluar si *gspD* fue transcrito con el sistema empleado, se realizó la extracción de ARN de la siguiente manera: Las muestras colectadas en el ensayo de inducción a las horas 1, 7 y del cultivo incubado durante toda la noche, se

colocaron en tubos de 2 ml y fueron centrifugadas a 19,000 X g durante 5 min para formar una pastilla y desechar el sobrenadante. Se agregaron 500 µl de solución de lisis para tejidos (0.05 M Tris HCl pH 8, 0.1 M EDTA, 0.5% Sarcosil P. V.), se reconstituyó la pastilla, se incubó 5 min a T.A. y se agregó 1 ml de TRIzol[®] Reagent (*life technologies*); se homogenizó en vortex durante 15 min y se incubó durante 5 min a T.A. Después de la incubación, se agregaron 200 µl de cloroformo, se homogenizó en vortex durante 15 seg, se incubó durante 5 min a T.A. y se centrifugó a 11,200 X g durante 10 min en refrigeración; se tomó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml. Se agregaron 500 µl de alcohol isopropílico para precipitar el ARN, se incubó durante 10 min a T.A. y se centrifugó a 11,200 X g durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el ARN fue lavado con 500 µl de etanol al 75% homogenizando con vortex y centrifugando a 11,200 X g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue desechado y los tubos se dejaron secar para después reconstituir el ARN con 100 µl de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). Una vez reconstituido el ARN, este fue tratado con ADNasa, para ello se emplearon 50 µl del ARN, 6 µl de Buffer 10X, 1 µl de ADNasa y 3 µl de agua DEPC. La mezcla fue incubada a 37°C durante 30 min, después de la incubación se agregaron 6 µl de EDTA 25 mM y se incubó durante 10 min a 65°C para inactivar la ADNasa.

El ARN obtenido fue empleado para evaluar la transcripción del gen mediante técnica de RT-PCR de un paso. Las condiciones empleadas para la RT-PCR se encuentran en el Cuadro 9 y el protocolo de termociclado se esquematiza en la Figura 12. Como control, para evaluar si el ARN no estaba contaminado con ADN, se omitió la RT de las muestras y se usaron las condiciones empleadas para la PCR que se proporcionan en el Cuadro 6 y el programa de termociclado fue el mismo que el esquematizado en la Figura 11.

Cuadro 8 Reacción de ligación de *gspD* con pET11a

Reactivo	[Inicial]	[Final]	Cantidad en μl
pET11a	50 ng/ μl	100 ng	2
<i>gspD</i>	30 ng/ μl	300 ng	9
T4 ADN lig.	1 U/ μl	1 U	1.5
Buffer	10X	1X	2
Agua	-----	Cbp** 20 μl	5.5
TOTAL			20 μl

**Cbp: Cuanto baste para

Cuadro 9 Condiciones para la RT-PCR en un sólo paso

Reactivo	[Inicial]	[Final]	Cantidad en μl
Iniciadores (P11F y R)	10 mM	0.5 mM	1 μl
RT (Transcriptasa)	200 u/ μl	40 u/ μl	0.2 μl
Taq Pol.	5 u/ μl	2 u/Rx*	0.4 μl
Inhibidor de ARNasas	40 u/ μl	4 u/Rx*	0.1 μl
MgCl ₂	30 mM	1.5 mM	1 μl
dNTPs	2 mM	0.4 mM	4 μl
Buffer Taq.	10 X	1 X	2 μl
ARN	----	10 μl /Rx*	10 μl
H ₂ O DEPC	----	Cbp** 20 μl	1.3 μl
TOTAL			20 μl

*Rx: Reacción **Cbp: Cuanto baste para

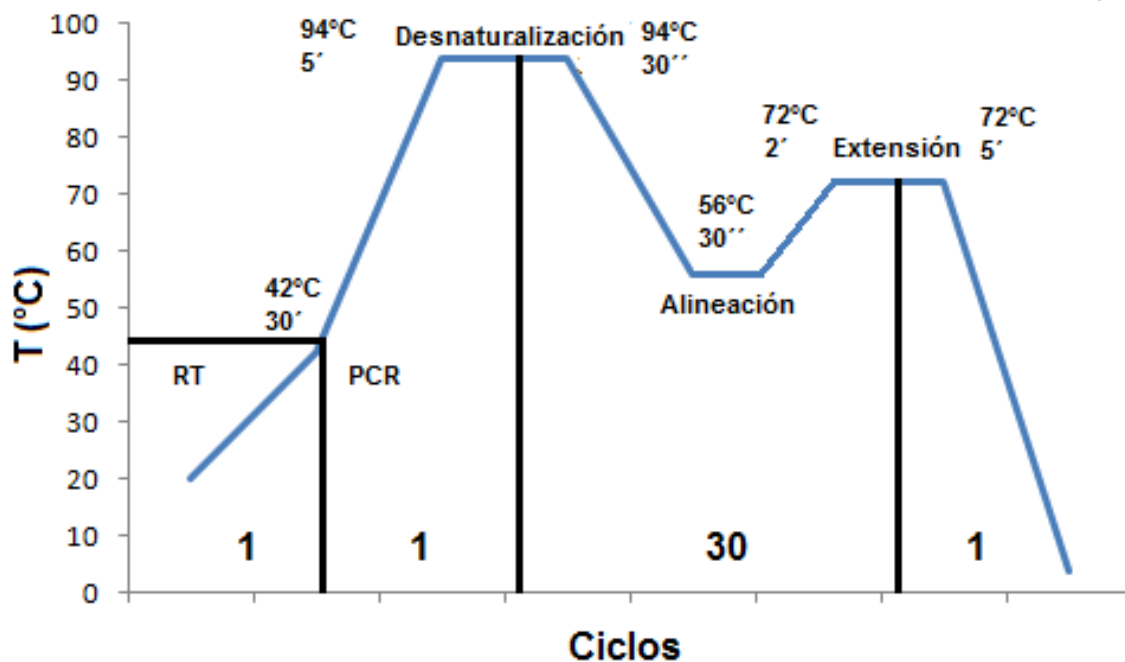


Figura 12. Termociclado empleado para la RT-PCR

Se realizó la RT-PCR en un sólo paso para lo cual las condiciones del termociclado comenzaron con un ciclo de 30 min a 42°C. A partir de este momento se continúa con el termociclado de la PCR Figura 11, el cual consiste de una desnaturalización inicial del ADN a 94°C durante 5 min, 30 ciclos de tres fases cada ciclo: una fase de desnaturalización del ADN a 94° durante 30", una fase de Alineación de los iniciadores empleados a 56°C durante 30" y una fase de extensión a 72°C durante 2 min. Una vez culminados los 30 ciclos la reacción de la PCR finaliza con una etapa de extensión final a 72°C durante 5 min.

Determinación *in silico* de epítopes específicos de GspD.

Comparación de secuencias de nucleótidos y aminoácidos

La secuencia de nucleótidos del gen *gspD* de LOCaS46 y su secuencia de aminoácidos fueron reportadas en estudios previos (Ordóñez López, 2010). Cada secuencia se analizó con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y UNIPROT (www.uniprot.org) para determinar su porcentaje de similitud entre especies de leptospiras patógenas y no patógenas. Además, la secuencia de aminoácidos se comparó con una secuencia de GspD de *E. coli*, ya que se utilizaron cepas de esta especie como sistemas de expresión.

Análisis Físicoquímico y predicción de epítopes B de GspD de LOCaS46

Para poder determinar los mejores péptidos candidatos que incluyan epítopes de GspD de LOCaS46 que sean reconocidos por células B, la secuencia de aminoácidos correspondiente fue analizada para identificar las regiones hidrofóbicas, hélices transmembranales, péptido señal y estructuras secundarias empleando los programas ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>), TMHMM Server v. 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/), SignalP 3.0 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), y PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), respectivamente. La predicción de péptidos inmunodominantes se determinó utilizando los programas BcePred (www.imtech.res.in/raghava/bcepred/) y ABCPred (www.imtech.res.in/raghava/abcpred/).

IV. RESULTADOS

Amplificación de *gspD*

Mediante la técnica de PCR con los iniciadores diseñados P11F y R (Cuadro 17, Apéndice 2) se logró la amplificación de *gspD* (1,818 pb) a partir de ADN genómico de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46. Para estandarizar la reacción de la PCR se realizó una PCR de gradiente, la temperatura de alineación en la cual los iniciadores empleados daban una mejor amplificación fue de 56°C; a 66°C la amplificación generada fue tenue, mientras que a 54°C y a 68°C no se logró la amplificación del gen de interés (Figura 13).

Escrutinio de las colonias DH5α recombinantes con *gspD*+Vector T.

Una vez lograda la amplificación de *gspD*, se procedió a su purificación y ligación en el vector T, el resultado de esta ligación fue empleada para transformar células DH5α, las cuales fueron inoculadas en placas de LB ampicilina, IPTG y X-Gal (100µg/ml, 260 µg/ml y 80 µg/ml respectivamente). De las colonias que crecieron, se descartaron aquellas que presentaron color azul y se seleccionaron las colonias de color blanco para hacerles una PCR de escrutinio con los iniciadores universales M13 (Figura 14), obteniendo una amplificación aproximada de 1,977 pb lo cual corresponde a 1,818 pb del gen y 159 pb de amplificación del plásmido. Las colonias que resultaron positivas (1 y 16) a la PCR con los iniciadores universales M13, fueron nuevamente evaluadas mediante PCR con iniciadores específicos para *gspD*, ambas colonias resultaron positivas a esta segunda prueba (Figura 14).

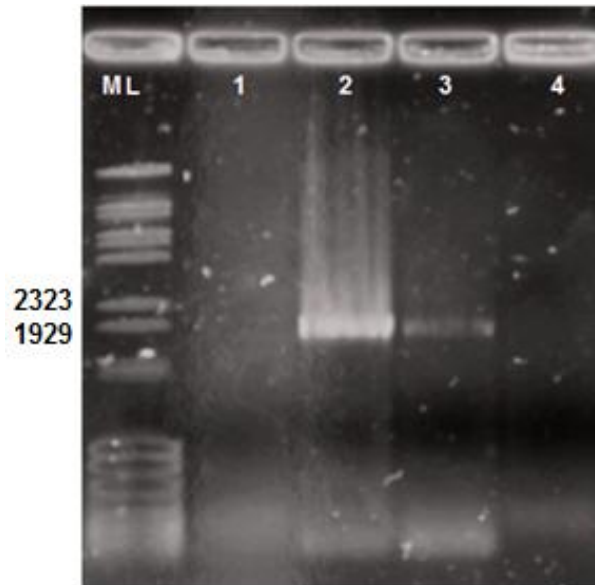


Figura 13. PCR de gradiente para la amplificación de *gspD*

Estandarización de la PCR para la amplificación de *gspD* a partir de ADN genómico de LOCaS46, la concentración de ADN, Iniciadores, *Taq* ADN Polimerasa, dNTPs, Buffer, $MgCl_2$ y H_2O fue constante, siendo la temperatura de alineación la única variable. ML: Marcador de longitud de ADN λ *Bst* EI; Carril 1: Temperatura de alineación (TA) de 54°C; Carril 2: TA de 56°C; Carril 3: TA de 66°C; Carril 4: TA de 68°C.

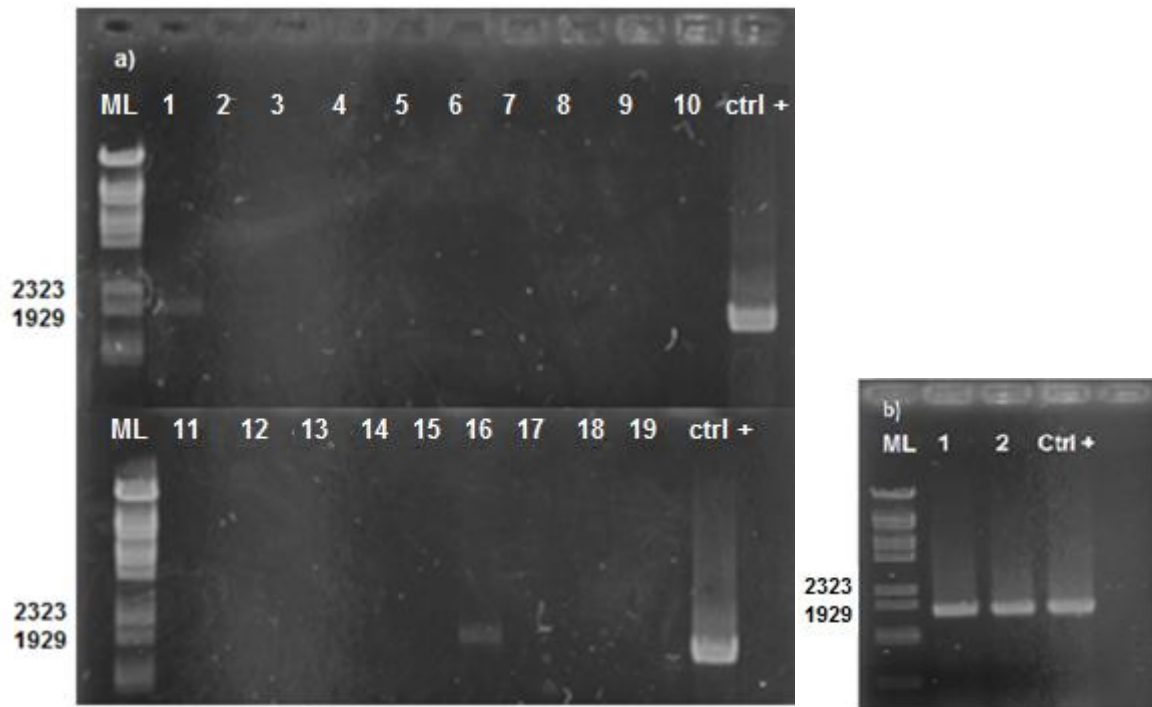


Figura 14. PCR de escrutinio con iniciadores M13 (*gspD* + Vector T) y con iniciadores P11Fy R (*gspD* + Vector T)

a) De las colonias blancas seleccionadas para el escrutinio mediante PCR, sólo las colonias 1 y 16 (Carriles 1 y 16) amplificaron con iniciadores específicos para M13 los cuales flanquean el sitio de clonación en el Vector T, la amplificación obtenida fue de un peso aproximado de 1,977 pb. ML: Marcador de longitud de ADN λ *Bst*EII; carriles numerados (1 al 19): colonias evaluadas; Ctrl: Amplificación de *gspD* a partir de ADN genómico de LOCaS46 (1,818 pb). b) Las colonias evaluadas generaron una amplificación de 1,818 pb con iniciadores específicos para *gspD* (P11Fy R). ML: Marcador de longitud de ADN λ *Bst*EII; Carril 1: colonia 1; Carril 2: colonia 16; Ctrl +: ADN genómico de LOCaS46.

Digestión del constructo *gspD* + Vector T

A las colonias 1 y 16, positivas a los ensayos de PCR tanto con iniciadores universales M13 y con iniciadores específicos para *gspD* (P11Fy R), se les extrajo el ADN de plásmido mediante la técnica de extracción de ADN de plásmido (pág. 36). El ADN obtenido fue sometido a un ensayo de digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* (Cuadro 7). La finalidad de la digestión fue asegurar que el fragmento amplificado (*gspD_L*) se encuentra en fase para su clonación y expresión en pET11a (Figura 15).

Escrutinio y secuenciación de colonias recombinantes con pET11a + *gspD*

El amplificado de *gspD* digerido y purificado fue ligado con pET11a, se obtuvieron colonias recombinantes con este constructo, las cuales fueron evaluadas por PCR de escrutinio con iniciadores específicos para *gspD*, resultando positivas las colonias 15 y 23 (Figura 16).

Se realizó una extracción de ADN de plásmido de la colonia 15 (positiva a la PCR de escrutinio), con la finalidad de evaluar si el inserto se ligó correctamente se realizaron ensayos de PCR con el ADN de plásmido obtenido. Para estos ensayos se emplearon iniciadores específicos para *gspD* (P11F + R, Cuadro 17, Apéndice 2) esperando una amplificación de 1,818 pb, con los iniciadores para pET11a (pET11aF + R) esperando una amplificación de 1,975 pb y otra reacción con los iniciadores combinados (pET11aF + P11R) esperando una amplificación de 1,880 pb. Las amplificaciones obtenidas fueron de las longitudes esperadas (Figura 17).

Después de confirmar de que el inserto se ligó correctamente, con el ADN del plásmido obtenido, se secuenciaron 2 reacciones de 700 ng del plásmido más 10 pmol del iniciador adelantado y reverso (un iniciador por reacción) para pET11a (Cuadro 17, Apéndice 2) en un volumen final de 16 µl cada reacción, las muestras fueron enviadas al Instituto de Biotecnología de la UNAM. Utilizando los programas Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y Sequencher 4.6, se analizó la secuencia obtenida, esta correspondió al gen *gspD* de *Leptospira* y se encontró en marco de lectura.

Escrutinio de colonias BL21 y Rosetta DE3 recombinantes con pET11a+*gspD*

Las colonias recombinantes obtenidas de *E. coli* BL21 transformadas con el ADN de plásmido secuenciado fueron evaluadas mediante una PCR de escrutinio con los iniciadores específicos para *gspD*. En este ensayo, las colonias 12, 14, 18, 23, 25 y 32 no amplificaron, todas las demás colonias evaluadas resultaron positivas al escrutinio (Figura 18). Aunado a esto, resultaron positivas 16 colonias recombinantes obtenidas de la transformación de las *E. coli* Rosetta DE3 evaluadas mediante la PCR de escrutinio con los iniciadores específicos para *gspD* (Figura 18).

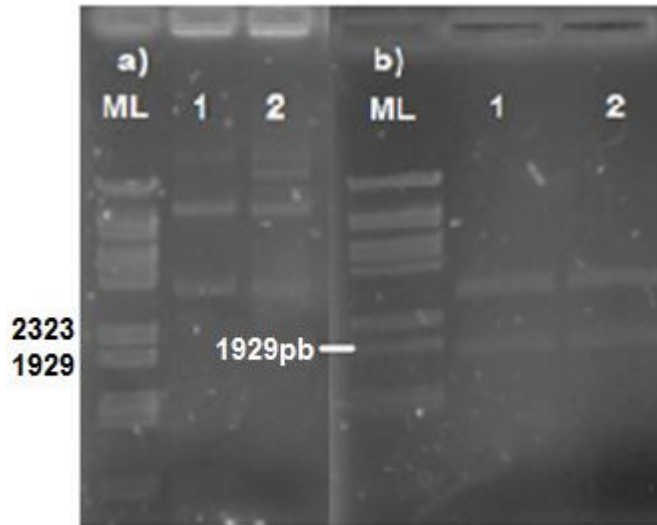


Figura 15. Extracción de ADN de plásmido y digestión.

Colonias 1 y 16 recombinantes con el constructo *gspD* + Vector T. Paneles: a) Producto de la extracción de ADN de plásmido; b) Producto de la reacción de la digestión, puede observarse la linearización del plásmido y la liberación de un inserto de un peso menor a 1,929 pb. ML: Marcador de longitud de ADN λ *Bst*EII; Carril 1: colonia 1; Carril 2: colonia 16.

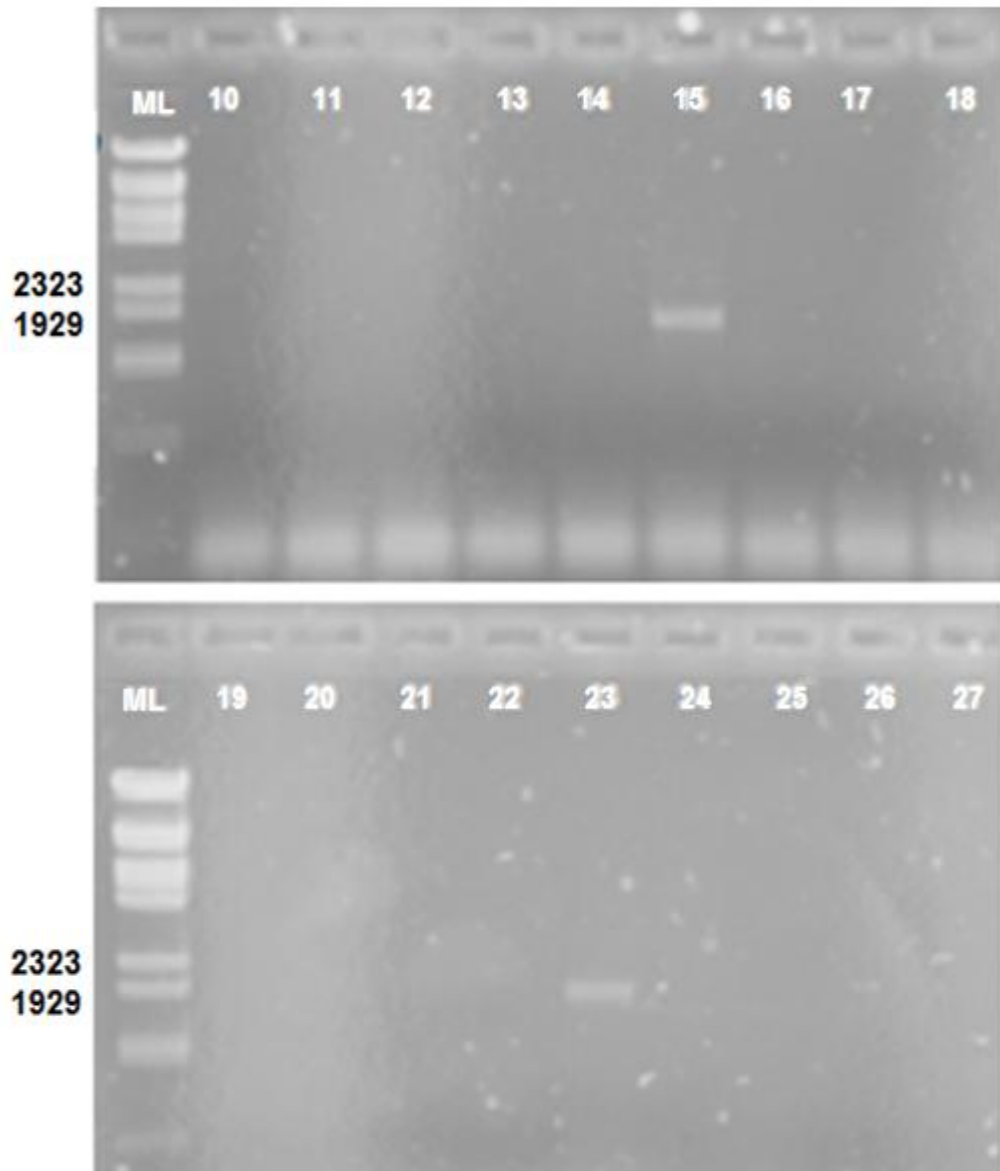


Figura 16. PCR de escrutinio a colonias DH5a recombinantes con pET11a y *gspD*

Las colonias 15 y 23 (Carriles 15 y 23) resultaron positivas a la PCR con los iniciadores específicos para *gspD* (P11F+R). ML: Marcador de longitud de ADN λ BstEII; carriles numerados: colonias evaluadas.

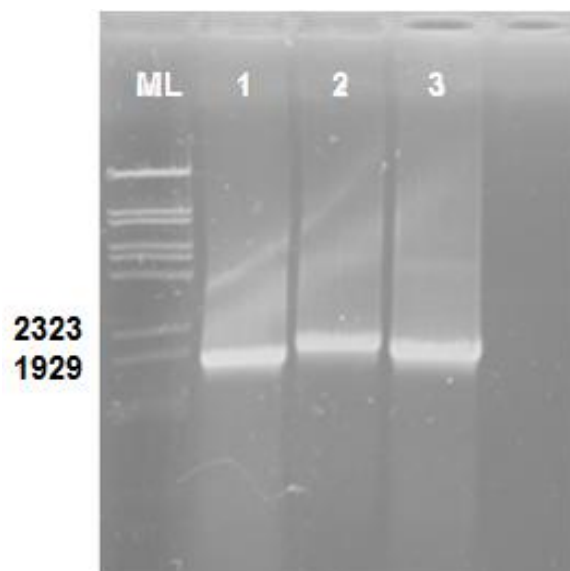


Figura 17. PCR de confirmación de ligación

La reacción de PCR se realizó bajo las condiciones descritas anteriormente para los PCR de escrutinio, se obtuvieron amplificaciones de longitudes diferentes que correspondieron a las longitudes esperadas en cada reacción (1: 1,818 pb, 2: 1,975 pb, 3: 1,880 pb). ML: Marcador de longitud de ADN λ *Bst*EII; Carril 1: Reacción de PCR con iniciadores específicos para *gspD* (P11F+R); Carril 2: Reacción de PCR con iniciadores específicos para pET11a (pET11aF+R); Carril 3: Reacción de PCR con iniciadores combinados (pET11aF + P11R).

Ensayo de inducción con IPTG para la expresión de GspD en células BL21

Se eligieron las colonias 15 y 21 de BL21 recombinantes para hacer los ensayos de expresión de la proteína mediante inducción con IPTG 1mM. Sin embargo, en estas células no se logró la expresión de GspD, cuando se induce a una absorbancia de 0.35 (OD_{600}), se observa un decaimiento del desarrollo bacteriano a una hora y media de la inducción (Figura 19), a las 3 horas post-inducción el desarrollo bacteriano comienza a aumentar (ver datos en Apéndice 1, Cuadro 13).

Cuando se hace la inducción a una absorbancia de 0.6 (OD_{600}), se observa un decaimiento del desarrollo bacteriano después de las 4 horas post-inducción (Figura 20). La misma condición fue observada al inducir a una absorbancia (OD_{600}) de 0.35, a las 6 horas post-inducción el desarrollo bacteriano comienza a aumentar (ver datos en Apéndice 1, Cuadro 14). En cuanto a la expresión de la proteína, empleando del programa Clone Manager 9 el peso de GspD fue estimado en 66.5 kDa sin la etiqueta de histidinas y de 67.3 kDa con la etiqueta de histidinas, sin embargo en los geles de poliacrilamida no se observa una banda que corresponda al peso esperado (Figura 21). Este resultado concuerda con el obtenido cuando la inducción se realiza a una absorbancia de 1 (OD_{600} , Figura 22); sin embargo, en este caso no se observa un decaimiento en la lecturas a 600 nm (ver datos en Apéndice 1, Cuadro 15).

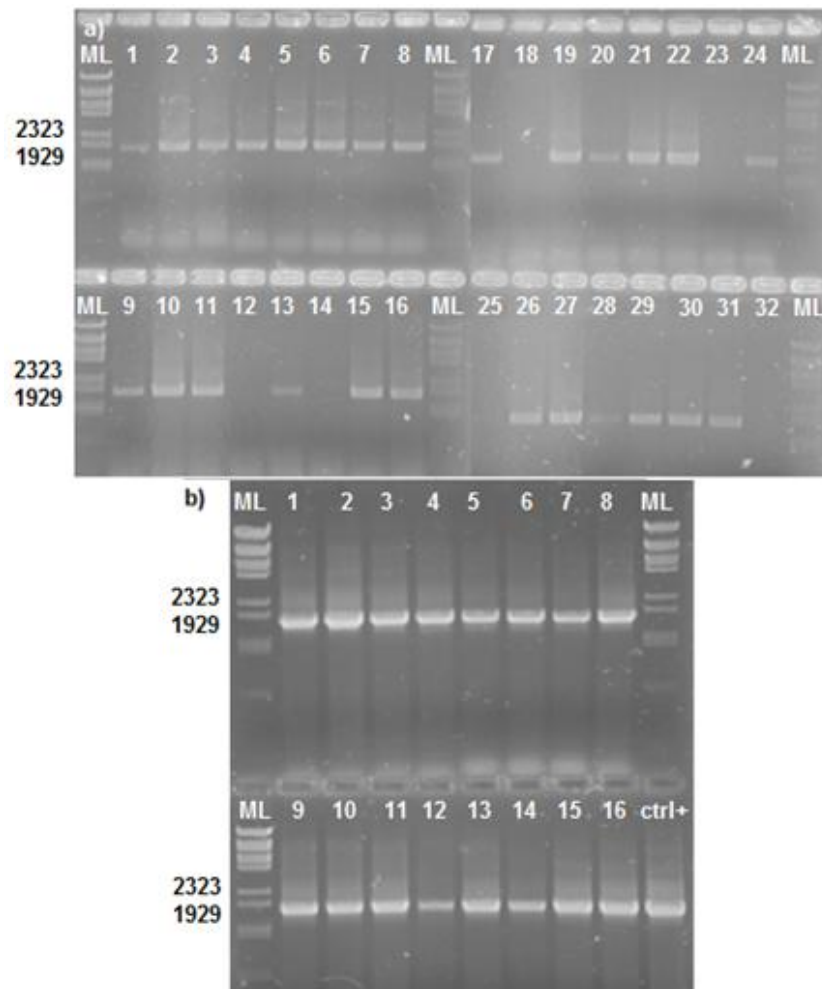


Figura 18. PCR de escrutinio a colonias de BL21 y Rosetta recombinantes con pET11a+gspD

a) Se emplearon iniciadores específicos para *gspD* (P11F+R), se evaluaron 32 colonias de BL21 recombinantes de las cuales las colonias 12, 14, 18, 23, 25 y 32 resultaron negativas al ensayo, el resto de las colonias generaron una amplificación de longitud esperada (1,818 pb). ML: Marcador de longitud de ADN λ *Bst*EII; carriles numerados (1 al 32): colonias evaluadas. b) Las 16 colonias de Rosetta recombinantes evaluadas resultaron positivas al emplear iniciadores específicos para *gspD* (P11F+R). ML: Marcador de longitud de ADN λ *Bst*EII; carriles numerados (1 al 16): colonias evaluadas; Ctrl +: ADN genómico de LOCaS46.

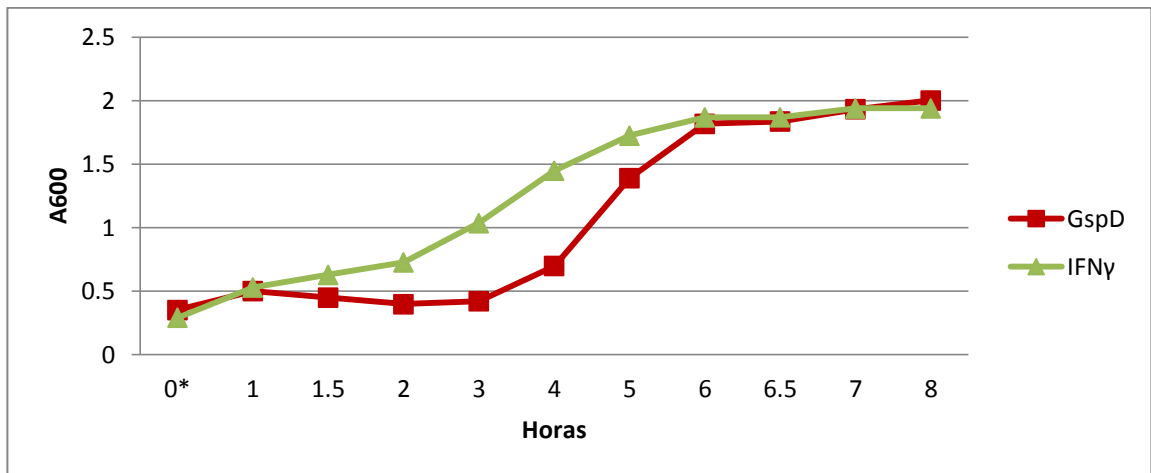


Figura 19. Inducción de la expresión de la proteína a una absorbancia de 0.35

Esta gráfica esquematiza el desarrollo de las células BL21 después de la inducción con IPTG, la inducción se realizó a la hora 0. Se utilizó como control de la expresión las mismas células transformadas con pET11a con un inserto que codifica para IFN γ . En el eje de las X se encuentran las horas post inducción, en el eje de las Y el valor obtenido de la lectura de la absorbancia a una OD₆₀₀. En línea roja células BL21 con la construcción pET11a + *gspD*, en línea verde células BL21 con la construcción pET11a + IFN γ .

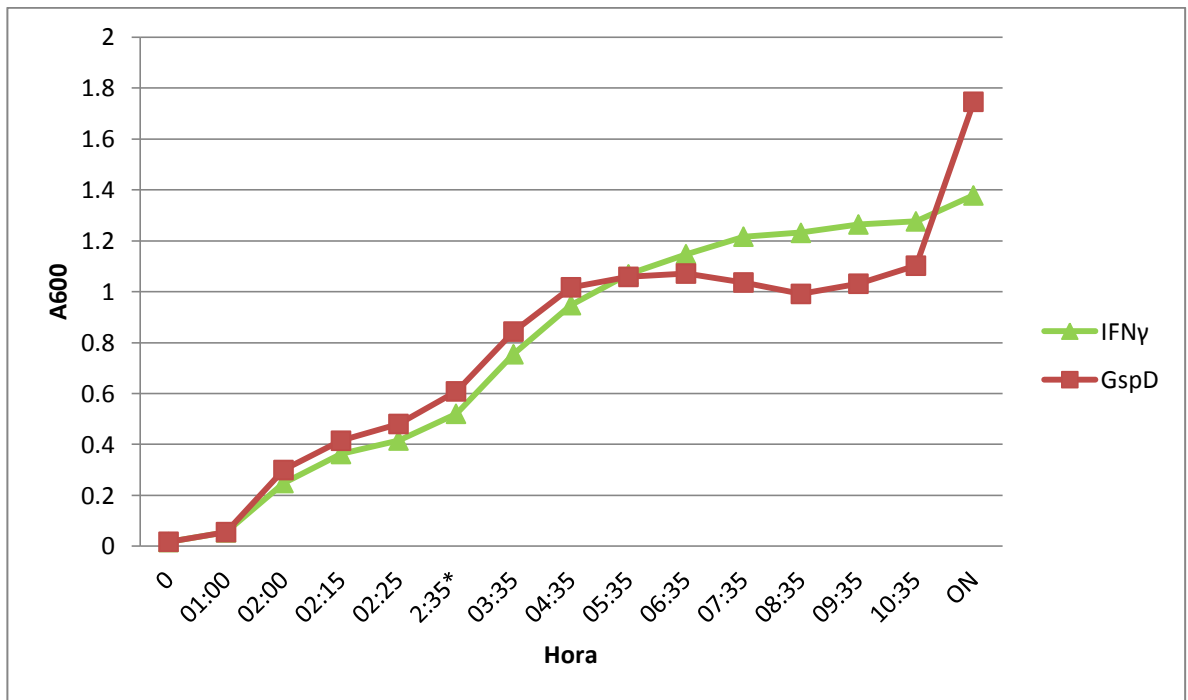


Figura 20. Inducción de la expresión de la proteína a una absorbancia de 0.6

Esta gráfica esquematiza el desarrollo de células BL21 antes y después de la inducción con IPTG, la inducción se realizó al alcanzar una absorbancia de 0.6 (eje de las Y) a las 2:35* horas post incubación (eje de las X). Posterior a la inducción la lectura de la absorbancia se realizó cada hora y una última lectura después de incubar toda la noche (22:35). En línea roja células BL21 con la construcción correspondiente a pET11a + gspD. Se utilizó como control de la expresión células BL21 con la construcción pET11a + IFN γ (línea verde).

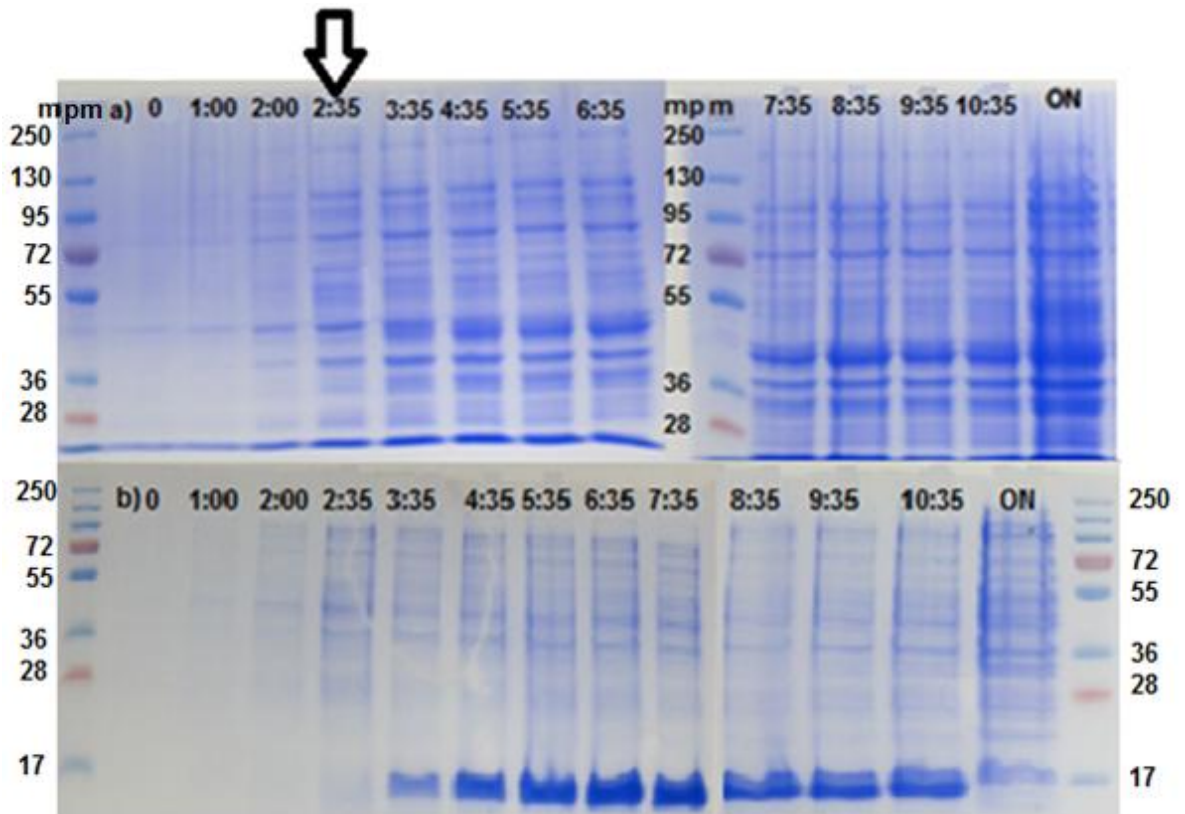


Figura 21. Gel de poliacrilamida del ensayo de inducción de la proteína a 0.6 de absorbancia

La hora 0 corresponde al momento en que se realizó la inoculación del medio con un cultivo bacteriano incubado durante toda la noche. La flecha indica la hora en que se realizó la inducción con IPTG, el marcador de peso molecular empleado fue PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder. Páneles: a) ensayo de inducción con IPTG 1 mM de células BL21 con la construcción pET11a + gspD, no se observa expresión de la proteína recombinante (67.3 kDa). b) corresponde al ensayo de inducción con IPTG 1mM de células BL21 con la construcción pET11a + IFN γ , se observa la expresión de la proteína recombinante (17 kDa).

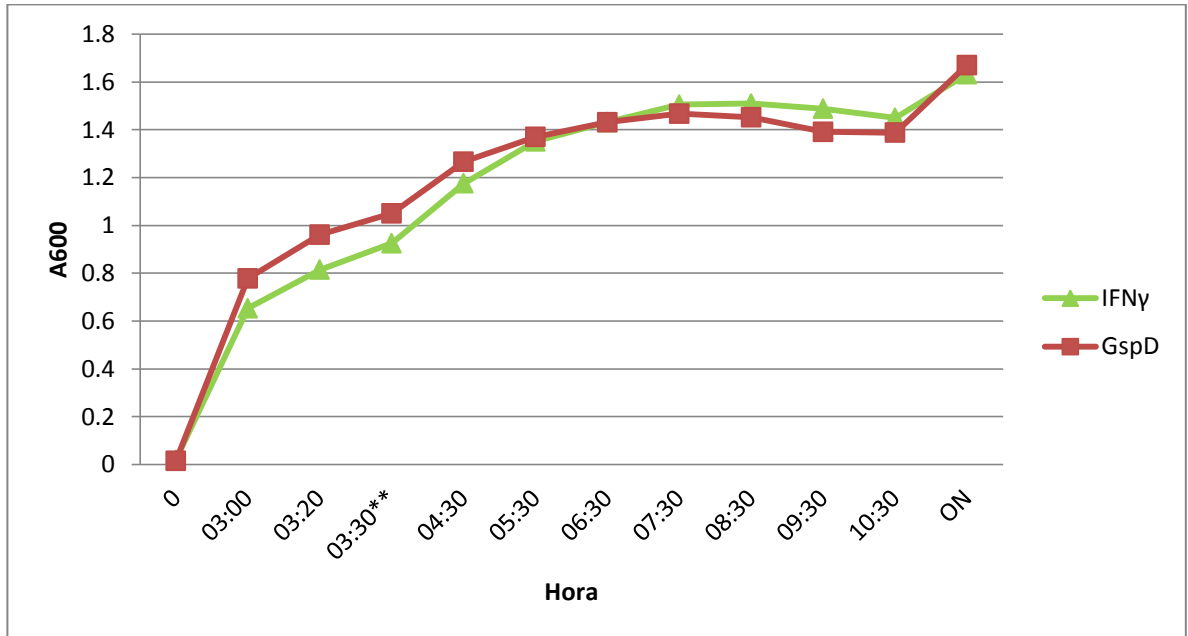


Figura 22. Inducción de la expresión de la proteína a una absorbancia de 1

Esta gráfica esquematiza el desarrollo bacteriano de células BL21 antes y después de la inducción con IPTG, la inducción se realizó al alcanzar una absorbancia (eje de las Y) de 1 (OD_{600}) a las 3:30 horas, posterior a la inducción la lectura de la absorbancia se realizó cada hora (eje de las X). En línea roja células BL21 con la construcción pET11a + *gspD*. Se utilizó como control de la expresión células BL21 con la construcción pET11a + IFN γ .

Ensayo de inducción con IPTG para la expresión de GspD en células Rosetta DE3

Tomando en consideración que la expresión de GspD de *Leptospira* involucra algunos codones raros para *E. coli* (Cuadro 10), se intentó su expresión en células Rosetta DE3, debido a que esta cepa posee el plásmido pRARE, el cual incluye los ARNt que codifican para estos codones raros (Novy *et al.*, 2001). Sin embargo, no se logró la expresión de la proteína recombinante GspD al realizar la inducción de la expresión con IPTG 1 mM cuando el cultivo alcanzó una absorbancia de 0.5 (OD₆₀₀). Para este ensayo de inducción se seleccionó la colonia 15 de Rosetta DE3 recombinante y una cepa de Rosetta sin la construcción (pET11a + *gspD*) para ser inducidas, al mismo tiempo como control se empleó la misma cepa 15 sin inducción, el desarrollo bacteriano de los tres grupos evaluados fue semejante (Figura 23; ver datos en Apéndice 1 Cuadro 16) y en los geles de acrilamida no se observó diferencia entre las tres condiciones (Figura 24).

Cuadro 10 Codones raros en *E. coli* presentes en *gspD*

Codones raros en <i>E. coli</i>		Uso para la expresión de GspD de <i>Leptospira</i>
Arg	AGA	El codón aparece 17 veces en <i>gspD</i>
	AGG	El codón aparece 2 veces en <i>gspD</i>
	CGA	El codón aparece 2 veces en <i>gspD</i>
Gly	GGA	El codón aparece 15 veces en <i>gspD</i>
Ile	AUA	El codón aparece 5 veces en <i>gspD</i>
Leu	CUA	El codón aparece 3 veces en <i>gspD</i>
Pro	CCC	El codón aparece 2 veces en <i>gspD</i>
En total los codones raros aparecen 46 veces en el gen (7.7%).		

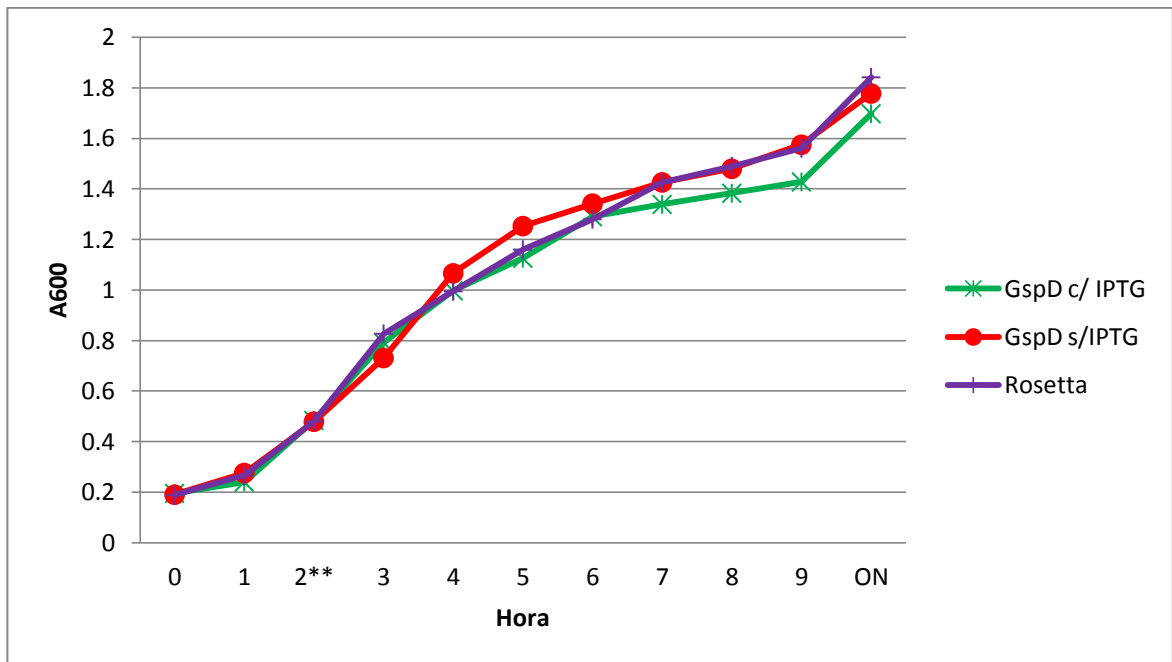


Figura 23. Ensayo de inducción con IPTG a una Absorbancia de 0.5

Esta gráfica esquematiza el desarrollo bacteriano de células Rosetta antes (horas 0 y 1) y después de la inducción con IPTG (de la hora 2 en adelante), la inducción se realizó cuando las células alcanzaron una absorbancia de 0.5 (OD_{600}) a la hora 2** de incubación, el desarrollo bacteriano fue semejante en los tres grupos. GspD c/ IPTG: Células *E. coli* Rosetta con la construcción pET11a + *gspD* inducidas con IPTG (línea color verde); GspD s/ IPTG: Células *E. coli* Rosetta con la construcción pET11a + *gspD* que no fueron inducidas (línea color rojo); Rosetta: células *E. coli* Rosetta sin la construcción molecular e inducidas como control (línea morada).

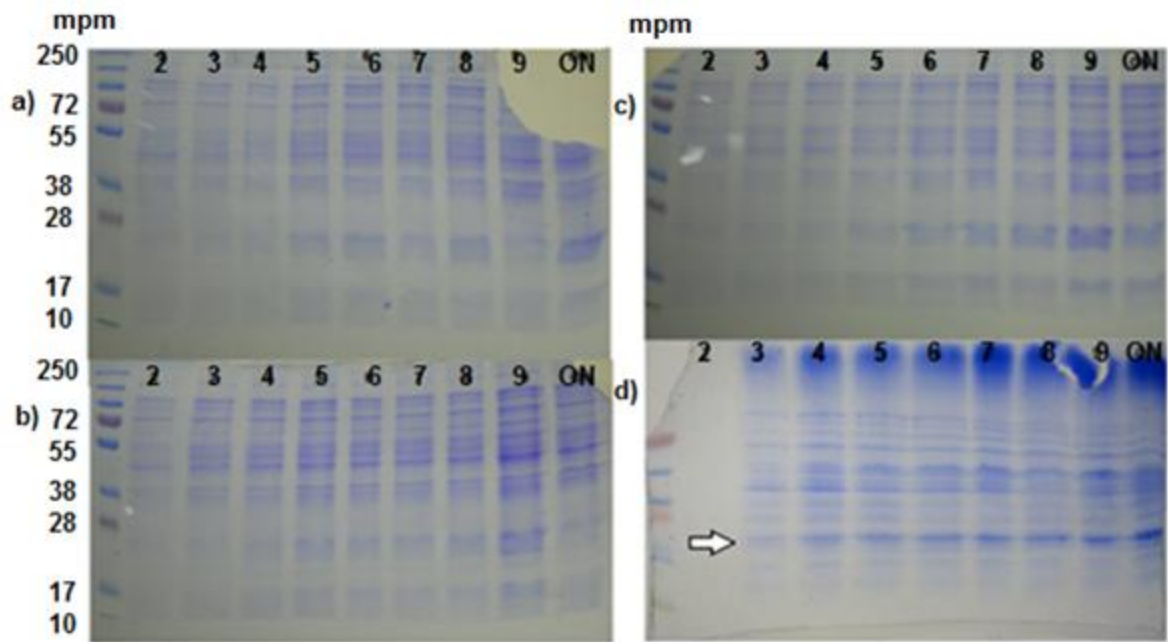


Figura 24. Gel de acrilamida del ensayo de inducción en Rosetta.

En esta electroforesis se corrieron muestras colectadas a cada hora posterior a la inducción con IPTG 1 mM, en el primer carril se colocó la muestra correspondiente a la hora 2 de incubación en la que los cultivos alcanzaron una absorbancia de 0.5 (OD_{600}) y fueron inducidos, no se observó la expresión de la proteína recombinante. El marcador de peso empleado molecular fue PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (mpm). Páneles: a) Células *E. coli* Rosetta con la construcción pET11a + *gspD* inducidas con IPTG; b) Células *E. coli* Rosetta con la construcción pET11a + *gspD* que no fueron inducidas; c) Células *E. coli* Rosettas sin la construcción molecular e inducidas con IPTG como control negativo; d) Células *E. coli* Rosetta con la construcción pET11a + Miostatina inducidas con IPTG como control positivo, la flecha en la imagen indica la proteína recombinante expresada.

De los tres grupos empleados en el ensayo de expresión, se seleccionaron muestras colectadas correspondientes a la hora 1 post-inducción, hora 7 post-inducción y de la incubación durante toda la noche para hacer inmunodetección Western, para lo cual se emplearon anticuerpos anti-His, anticuerpos anti-GspD de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo Hardjobovis, anticuerpos anti-Canicola de referencia Hond Utrecht IV y un suero de bovino positivo a leptospirosis mediante la prueba de aglutinación microscópica. Al emplear anticuerpos anti-His en la inmunodetección Western, se pretendía identificar la etiqueta de hisitidinas que debe de poseer la proteína recombinante con base en la construcción molecular, pero no se detectó ninguna banda (Figura 25). Al emplear anticuerpos anti-Canicola, se lograron detectar múltiples bandas, las cuales en su mayoría coincidieron en todas las muestras evaluadas, se observó una banda tenue que podría ser GspD (entre 55 y 72 kDa), esta banda se detectó en los cultivos de las bacterias recombinantes y en las proteínas totales de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa Hond Utrecht IV (Canicola de referencia), sin embargo, también se detectó en la muestra correspondiente a *E. coli* Rosetta DE3 sin inserto (Figura 26). Al emplear el suero de bovino positivo a leptospirosis mediante la prueba de aglutinación microscópica no se observó banda en el peso esperado (67.3 kDa) en ninguna de las muestras empleadas (Figura 27). Sin embargo, cuando la inmunodetección fue realizada con el anticuerpo anti-GspD, se logró la detección de una banda en el peso esperado, pero al igual que con los anticuerpos anti-Canicola de referencia, esta banda estuvo presente en todas las muestras evaluadas (Figura 28). Con el resultado obtenido, surgió la duda si se estaba llevando a cabo la transcripción del gen en el plásmido, para ello se realizó la extracción de ARN de las muestras evaluadas. El ARN obtenido fue sometido a la técnica de RT-PCR, de la cual se obtuvo como resultado una amplificación correspondiente al peso esperado del inserto en las

muestras de *E. coli* Rosetta DE3 pET11a + *gspD* + IPTG tomadas a la hora 1 y 7 post inducción, y también se observó la misma amplificación en las muestras de *E. coli* Rosetta DE3 pET11a + *gspD* sin inducir tomadas a las hora 1 y 7. En las muestras tomadas después de la incubación durante toda la noche no se logró ningún amplificado (Figura 29).

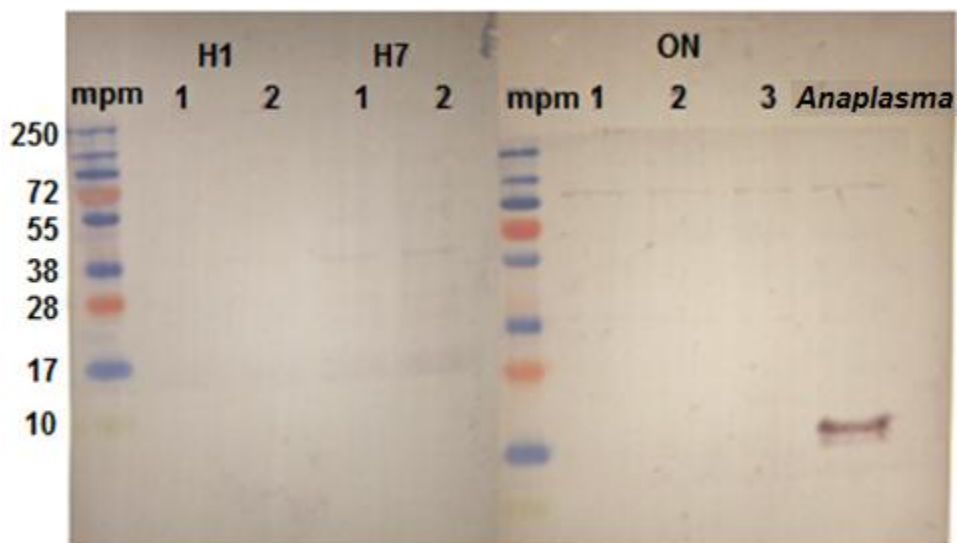


Figura 25. Inmunodetección Western con anticuerpos anti-His

No se logró la detección de la expresión de la proteína recombinante (67.3 kDa), para evaluar el funcionamiento del sistema se empleó como control una proteína recombinante de *Anaplasma* con etiqueta de histidina. mpm: Marcador de peso molecular (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder); H1: Muestras colectadas una hora post-inducción; H7: Muestras colectadas 7 horas post-inducción; ON: Muestras colectadas después de la incubación durante toda la noche; 1: Muestra correspondiente a la construcción pET11a + *gspD* + IPTG; 2: Muestra correspondiente a la construcción pET11a + *gspD* – IPTG; 3: Muestra correspondiente al cultivo de *E. coli* Rosetta DE3 sin inserto + IPTG.

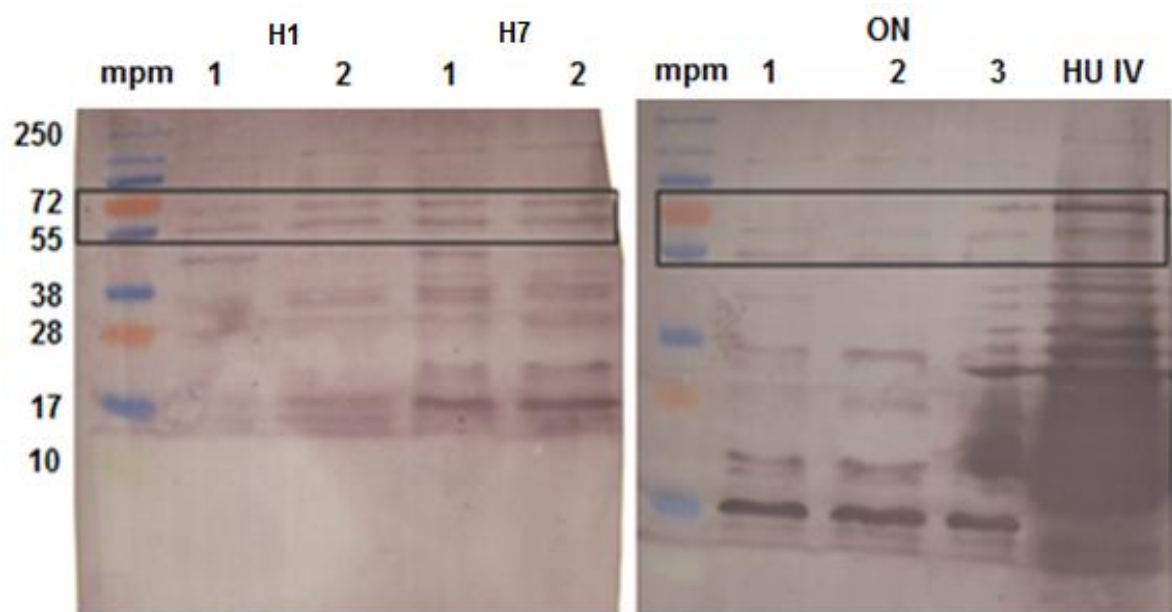


Figura 26. Inmunodetección Western con anticuerpos anti- Canicola de referencia

Detección de múltiples bandas presentes en todas las muestras que podrían corresponder a proteínas de *E. coli*, dentro de las cuales una banda de muy tenue podría ser GspD (67.3 kDa). mpm: Marcador de peso molecular (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder); H1: Muestras colectadas una hora post-inducción; H7: Muestras colectadas 7 horas post-inducción; ON: Muestras colectadas después de la incubación durante toda la noche; 1: Muestra correspondiente a la construcción pET11a + *gspD* + IPTG; 2: Muestra correspondiente a la construcción pET11a + *gspD* – IPTG; 3: Muestra correspondiente al cultivo de *E. coli* Rosetta DE3 sin inserto + IPTG; HU IV: Proteínas totales de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa Hond Utrecht IV.

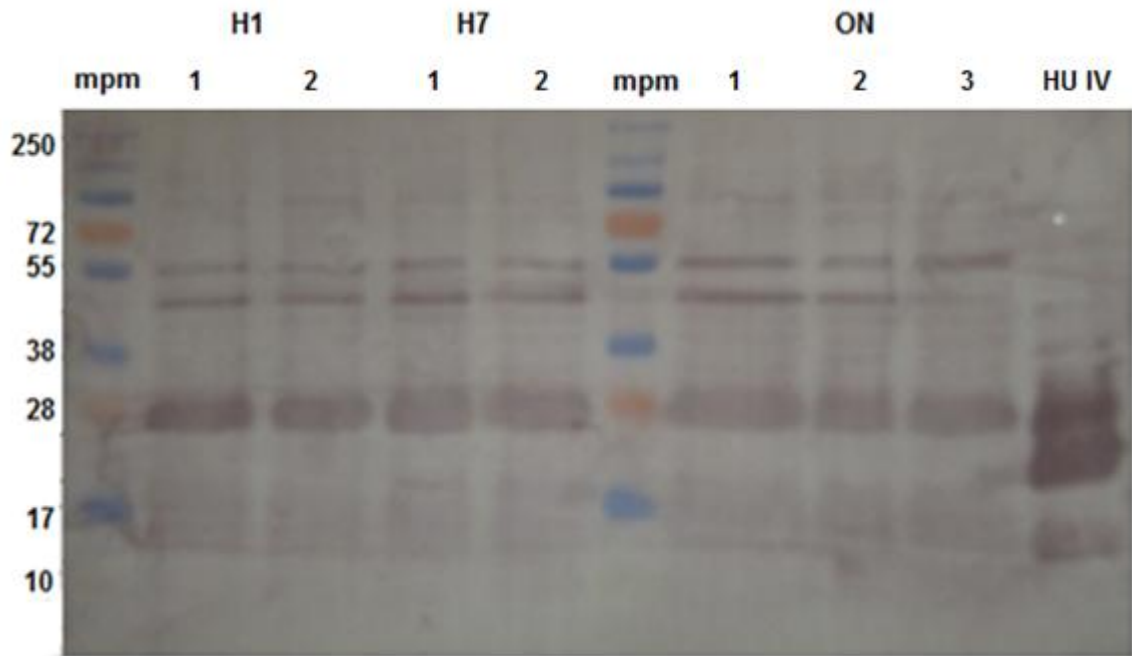


Figura 27. Inmunodetección Western con anticuerpos de bovinos positivos en la prueba de aglutinación microscópica

No se detectó banda en el peso esperado, se observan otras bandas que podrían ser proteínas de *E. coli*, aunque algunas de estas también se observan HU IV. mpm: Marcador de peso molecular (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder); H1: Muestras colectadas una hora post-inducción; H7: Muestras colectadas 7 horas post-inducción; ON: Muestras colectadas después de la incubación durante toda la noche; 1: Muestra correspondiente a la construcción pET11a + *gspD* + IPTG; 2: Muestra correspondiente a la construcción pET11a + *gspD* – IPTG; 3: Muestra correspondiente al cultivo de *E. coli* Rosetta DE3 sin inserto + IPTG; HU IV: Proteínas totales de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa Hond Utrecht IV.

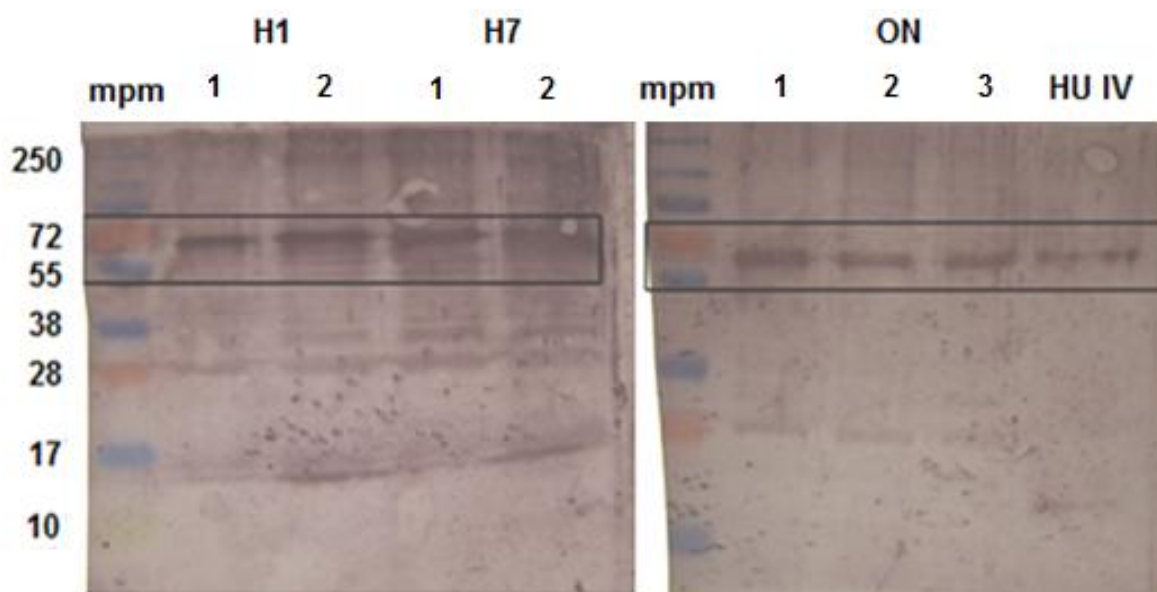


Figura 28. Inmunodetección Western con anticuerpos anti-GspD de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis)

Se detectó una banda en el peso esperado en todas las muestras evaluadas y en HU IV, sin embargo, también estuvo presente en la muestra correspondiente a *E. coli* no recombinante (3). mpm: Marcador de peso molecular (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder); H1: Muestras colectadas una hora post-inducción; H7: Muestras colectadas 7 horas post-inducción; ON: Muestras colectadas después de la incubación durante toda la noche; 1: Muestra correspondiente a la construcción pET11a + *gspD* + IPTG; 2: Muestra correspondiente a la construcción pET11a + *gspD* – IPTG; 3: Muestra correspondiente al cultivo de *E. coli* Rosetta DE3 sin inserto + IPTG; HU IV: Proteínas totales de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa Hond Utrecht IV.

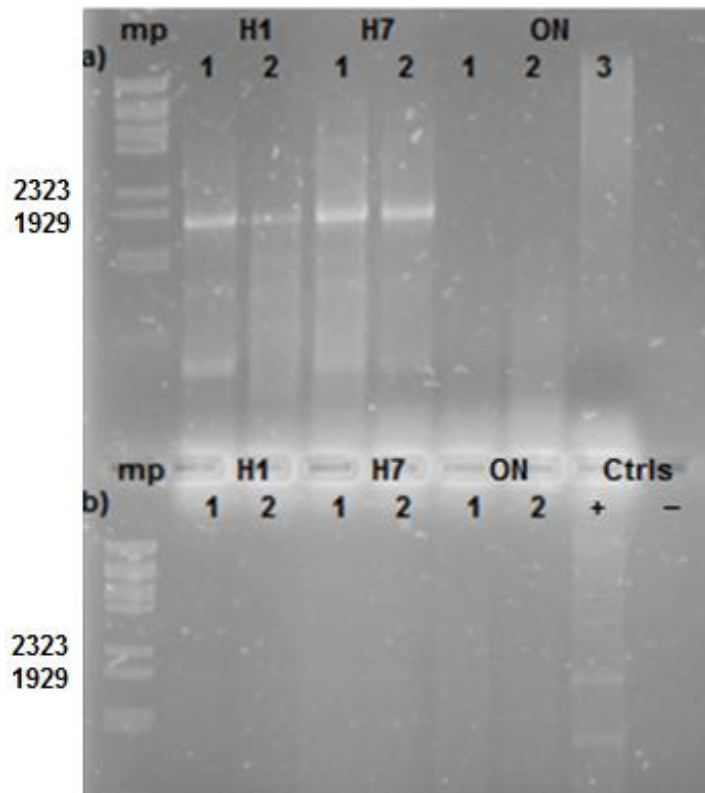


Figura 29. RT-PCR para la evaluación de la transcripción

a) RT-PCR con iniciadores específicos para *gspD*, se logró una amplificación de peso esperado (1818 pb) en las muestras correspondientes a las *E. coli* Rosetta DE3 recombinantes colectadas 1 y 7 horas post-inducción, en las muestras correspondientes a las colectadas después de la incubación durante toda la noche no se logró la amplificación. b) PCR con iniciadores para pET11a, no se logró amplificación en ninguna de las muestras, lo que indica que no existió contaminación con ADN, en este ensayo se incluyó un control negativo y uno positivo en el cual se empleó ARN de una colonia recombinante sin ser tratado con ADNasa. mp: Marcador de peso molecular λ BstEII; H1: Muestras colectadas una hora post-inducción; H7: Muestras colectadas 7 horas post-inducción; ON: Muestras colectadas después de la incubación durante toda la noche; Ctrls: Controles positivo y negativo; 1: Muestra correspondiente a la construcción pET11a + *gspD* + IPTG; 2: Muestra correspondiente a la construcción pET11a + *gspD* – IPTG; 3: Muestra correspondiente al cultivo de *E. coli* Rosetta DE3 sin inserto + IPTG.

Determinación de epítopes de GspD.

El gen *gspD* en *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola (LOCaS46) tiene una longitud de 1,791 pb (Apéndice 2). Al hacer un análisis Blast-n (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de este gen, se observó una identidad total del 99% con *Leptospira interrogans* serovariedades Lai cepa 56601 y Copenhageni cepa Fiocruz; es preciso resaltar que estas dos serovariedades pertenecen a la misma especie, en tanto que, con una especie diferente como *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjobovis cepas L550 y JB197 tiene una máxima identidad del 83% de una cobertura del 99%, es decir, tiene una identidad total del 82.17% (Cuadro 11). Por otra parte, al analizar la secuencia de aminoácidos de GspD de LOCaS46 que tiene una longitud de 596 aminoácidos (Apéndice 2) con Blast-p en Uniprot, se observa que tiene una alta homología con la proteína GspD de *Leptospira interrogans* serovariedad Copenhageni cepa Fiocruz (99%) y de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjobovis cepa L550 (91.08%). Es preciso destacar que ambas son especies patógenas, pero al compararse con leptospiras no patógenas como *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc la identidad total que tienen es de 58.9% y finalmente al compararla con la proteína GspD de *E. coli* B185 tiene una identidad total de 25.23% (Cuadro 11).

Cuadro 11 Análisis Blast-n y Blast-p de *gspD* y GspD de LOCAS46

<i>Gen investigado</i>	Secuencia de referencia	Acceso al gene bank	Cobertura	Máxima Identidad	Identidad Total
<i>gspD</i>	<i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Lai str. 56601	AE010300.2	100%	99%	99%
<i>gspD</i>	<i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Copenhageni str. Fiocruz	AE016823.1	100%	99%	99%
<i>gspD</i>	<i>Leptospira borgpetersenii</i> serovariedad Hardjobovis L550	CP000348.1	99%	83%	82.17%
<i>gspD</i>	<i>Leptospira borgpetersenii</i> serovariedad Hardjobovis JB197	CP000350.1	99%	83%	82.17%
GspD	<i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Copenhageni str. Fiocruz	YP001529.1	100%	99%	99%
GspD	<i>Leptospira borgpetersenii</i> serovariedad Hardjobovis L550	YP798029.1	99%	92%	98%
GspD	<i>Leptospira biflexa</i> serovariedad Patoc	YP0018390 58.1 ABF47508.1	95%	62%	58.9%
GspD	<i>E. coli</i> B185	ZP0665904 6.1	87%	29%	25.23%

En cuanto a las propiedades físico-químicas de GspD, con el programa CLC Main Workbench 6.8 se confirmó que la proteína tiene una longitud de 596 aa, tiene un peso de 66.494 kDa, un punto isoeléctrico de 8.66 y una vida media de 10 horas en *E. coli*, la composición atómica de la proteína se muestra en el Cuadro 12.

Cuadro 12 Composición atómica de GspD

Átomo	Cuenta	Frecuencia
Hidrogeno (H)	4,850	50.87%
Carbono (C)	2,977	31.22%
Nitrógeno (N)	798	8.37%
Oxígeno (O)	903	9.47%
Azufre (S)	7	0.07%

Los aminoácidos que están más presentes en GspD son isoleucina (10.7%), lisina (9.1%), leucina (8.9%), ácido glutámico (8.6%) y serina (7.7%), por otro lado los aminoácidos que menos presencia tienen son triptófano (0.7%), histidina (0.8%), metionina (1.2%) y tirosina (1.7%), GspD no posee ninguna cisteína (Figura 30). Se obtuvieron las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas (Figura 31) y también se determinaron dos regiones hidrofóbicas importantes las cuales corresponden a hélices alfa en la estructura secundaria de la proteína (Figura 31), con el programa PSIPRED se determinó que la región hidrofóbica que se encuentra en la región amino de la proteína corresponde al péptido señal, la región hidrofóbica que se encuentra alrededor del aminoácido 300 corresponde a una hélice transmembranal, además de esto la proteína tiene una región extracelular y una citoplasmática (Figura 32), Reichow *et al.*, en 2010, demostró que estas regiones se ubican en las regiones carboxilo y amino respectivamente.

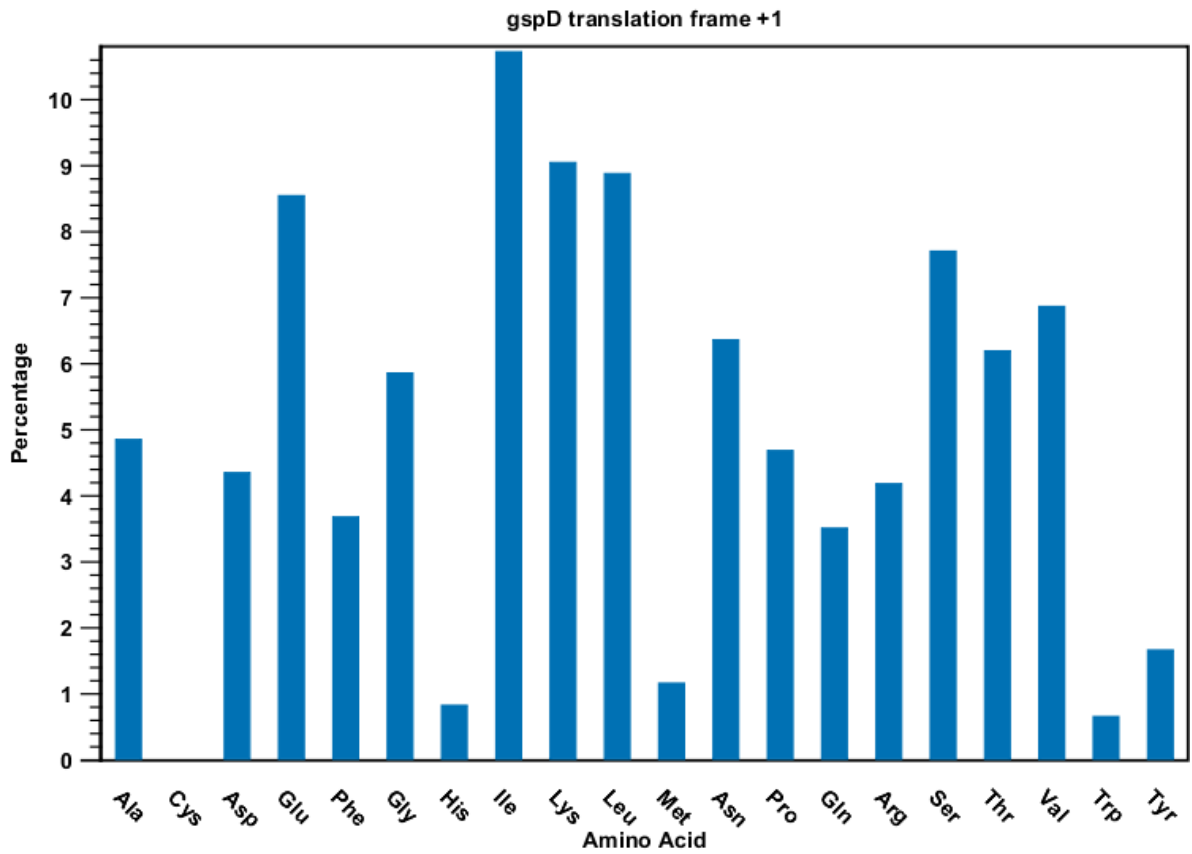


Figura 30. Distribución de los aminoácidos en GspD

En esta gráfica puede observarse que la cisteína no está presente en GspD y que el aminoácido más abundante es isoleucina, seguido de lisina y leucina, los que menos presencia tienen son histidina, metionina, tirosina y triptófano (gráfica obtenida del programa CLC Main Workbench 6.8).

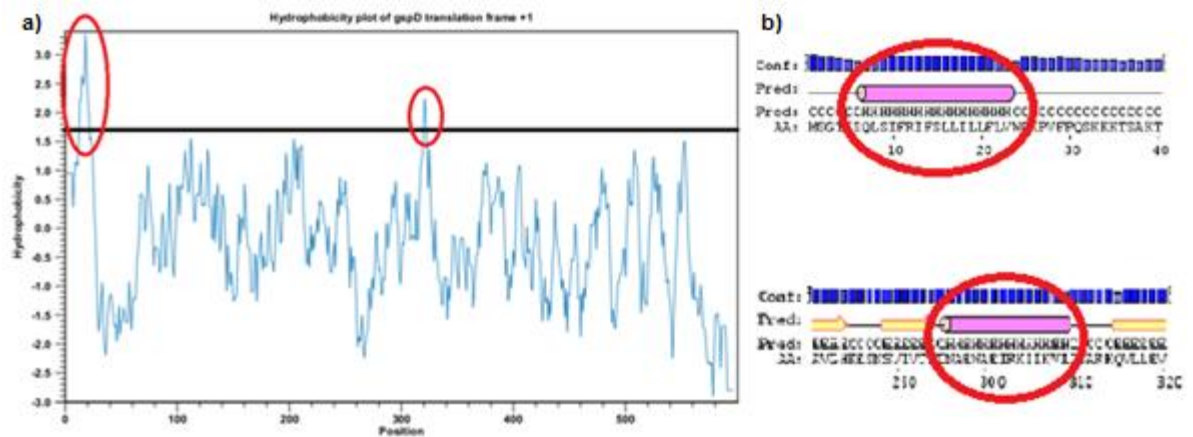


Figura 31. Regiones hidrofóbicas de GspD

a) Se Determinaron dos regiones hidrofóbicas importantes de GspD (ovalos de color rojo), en la escala Kyte y Doolittle los valores mayores a 1.6 indican regiones hidrofóbicas importantes (CLC Main Workbench 6.8, ProtScale en el sitio web <http://web.expasy.org/protscale/>). b) Ambas regiones hidrofóbicas son reconocidas como hélices alfa con el programa PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

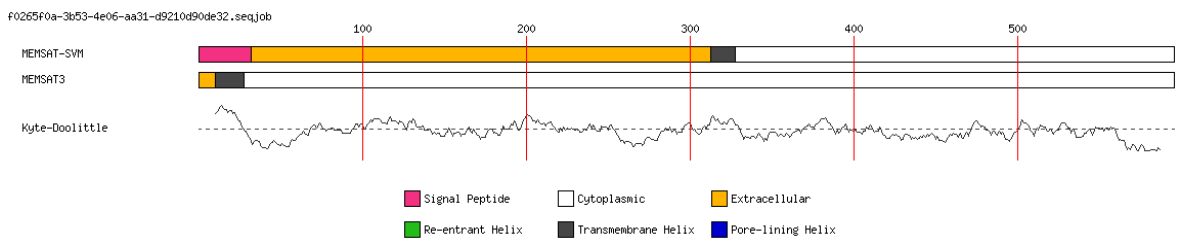


Figura 32. Determinación de las regiones de GspD

La secuencia de 1,791 pb de GspD que codifica para 596 aminoácidos comprende un péptido señal en la región amino (rosa), una región extracelular (amarillo), una hélice transmembranal (gris oscuro) y una región citoplasmática (blanco) según el programa PSIPRED.

Finalmente, la predicción de péptidos inmunodominantes fue determinada con base en el análisis de los resultados obtenidos con los programas BcePred Prediction Server (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>) y ABCPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>), para lo cual se localizaron los epítopes predichos en la secuencia de aminoácidos de GspD de LOCaS46 y se eligieron como candidatos a péptidos cuatro regiones en las cuales empalmaron epítopes predichos por ambos programas (Figura 33):

Secuencia péptido 1:

95- EIPIKNGFIFMKSVLESLGFGVVEEPDLISIVKIKDALARSPIVRVG -141
47 aminoácidos.

Secuencia péptido 2:

156- ITQVIPIENVKPEELEPILKRLTSPNTDVIVYRNTNTI -193
38 aminoácidos.

Secuencia péptido 3:

405- PQVLTVDNQEAIEISVGQDVPVRTQSRNAGTGGTNAVTVDNYEYRPTGIKL
KFTPHV NK -462
58 aminoácidos.

Secuencia péptido 4:

505- SIVIGGLISNDKQKRIIKIPFLGDIPYLGHLFKRTTEKIKKTNLMVFITPHILDS
RETADKMTVK -569
65 aminoácidos.

```

>LOCaS46 596 bp
MSGTISQLSIFRIFSLILFLVWDPVFPQSKKTSAKTKSVTQEEPSEKTFYANWRDT
EINDFLKGMSAIILKKNILIDE SLKGGKITIISQK EIPKNGFIFMKSVMESLGFGVVVEE
DLISIVKIKDALARSPIVRVGKELIPEEEVGDYRTITQVIPIENVKPEELEPILKRLTSP
NTDVIIVYRNTNTIIVLSGSAADINKLLVLVSEFDVKIEEATPGSISSAGDIHIYTFYSEA
EKIAATLVKLDNPVIQSEDLSSERKPPPPGQMPKVDKIKAVGHKESNSVIVTATNAEWA
EIRKIIKVLDSARKQVLLVLIIVELTSSDLNDFGIDWRYKGEAFGQFNSGLSKEANIINS
NGQVNPNTLSGFSGLGFLKAGSEQIIGILSANQGNENFNVLSA PQVLTVDNQEAEISVG
QDVEVRFQSRNAGTGGTNAVTVDNYEYRPTGIKIKETPHVINKINKITLFLFQEIKNIAEI
ALAGGNPTFNRREIKTSSISIENTQSIIVIGGLISNDKQKRLLIKIPFLGDIPYLGHLEKRTT
EKIKKTNLMVFITFTITDSRETADKMTVKAKMQQERYELERERILNKEREIRERGD

```

Figura 33. Predicción de péptidos inmunodominantes de GspD

- Predicción con el programa BcePred Prediction Server
- Predicción con el programa ABCPred
- Epítopes de un mismo programa que empalman en la secuencia
- Epítopes de dos diferentes programas que empalman en la secuencia
- Tres epítopes o más que empalman en la secuencia
- Regiones elegidas como candidatos a péptidos

Los péptidos 3 y 4 se encuentran en la región carboxilo dentro del dominio funcional de la secretina, esta región corresponde a la parte extracelular de la proteína (Figura 34).

```
>LOCa546 596 aa.
MSGTISQLSIFRIFSLILLFLVWDPVFPQSKKTSKTKSVTQEPESEKTFYANWRDT
ELNDFLKGMSAILKKNILLDESLKGGKITIISQKEIPIKNGFIFMKSLES LGFGVVEEP
DLISIVKIKDALARSPIVRVGKELIPEEEVGDYRTITQVIPIENVKPEELEPILKRLTSP
NTDVIVYRNTNTIVLSGSAADINKLLVLVSEFDVKIEEATPGSISSAGDIHIYTTYSEA
EKIAATLVKLDNPVIQSEDLSSERKPPPPGQMPKVDKIKAVGHKESNSVIVTATNAEWA
EIRKIIKVLDSARKQVLLVLELVLTSSDLNDFGIDWRYKGEAFGQFNSGLSKEANIINS
NGQVNPNTILSGFSLGFLKAGSEQIIGILSANQGNENFNVL SAPQVLTVDNQEAEISVG
QDVPVRTQSRNAGTGGTNAVTVDNYEYRPTGIKLFKTPHVNKNNKITLELFQEIKNIAEI
ALAGGNPTFNRREIKTSISIENTQSVIGGLISNDKQKRIIKIPFLGDIPYLGHLFKRTT
EKIKKTNLMVFITPHILDSRETADKMTVKKKMQQERYELERERILNKEREIRERGD
```

Secuencia péptido 3:

PQVLTVDNQEAEISVGQDVPVRTQSRNAGTGGTNAVTVDNYEYRPTGIKLFKTPHVNK

El cual tiene una ubicación entre los aminoácidos 405 al 462, con una longitud de 58 aminoácidos.

Secuencia péptido 4:

SVIGGLISNDKQKRIIKIPFLGDIPYLGHLFKRTTEKIKKTNLMVFITPHILDSRETADKMTVK

El cual tiene una ubicación entre los aminoácidos 505 al 569, con una longitud de 65 aminoácidos.

Figura 34. Predicción de la región inmunodominante de GspD

Los aminoácidos sombreados en amarillo comprenden el dominio funcional de la secretina, la región comprendida entre los aminoácidos de color verde no fue detectada como inmunodominante por ninguno de los dos programas utilizados para esta predicción. Los aminoácidos de color negro (P-K) y celeste (S-K) delimitan secuencias determinadas como inmunodominantes con los dos programas utilizados para esta predicción.

V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Amplificación y construcción molecular

En este estudio se logró la amplificación de la secuencia completa del gen *gspD* a partir de ADN genómico de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 y fue clonado en un vector T (InstAclone™ PCR Cloning Kit) y finalmente en pET11a (Novagene®) para su expresión con una etiqueta de histidinas en la región carboxilo de la proteína. En estudios similares, el gen completo o fragmentos que codifican para la proteína equivalente en otros géneros bacterianos han sido amplificados y clonados en diferentes sistemas: Fragmento del gen que corresponde a la parte periplásmica de la proteína (residuos 1 al 237) fue amplificado de ADN genómicos de *E. coli* enterotoxigénica (cepa H10407) y fue clonado en el vector pProEX HTb y expresada en *E. coli* BL21 con una etiqueta de 6 histidinas en la región amino de la proteína seguido por un sitio de rompimiento para la proteasa TEV (Korotkov *et al.*, 2010); clonación del gen completo (incluyendo el péptido señal) que codifica para GspD de *V. cholerae* en vector pET22b con una etiqueta de histidinas en la región carboxilo de la proteína y expresada en células Turner (DE3). Rodríguez Reyes (2007), amplificó 1,533 pb de un total de 1,797 pb de *gspD* de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo, Hardjobovis y logró su clonación y expresión en el vector pET28a. De igual manera se ha logrado la amplificación y clonación de diferentes genes que corresponden a proteínas conservadas de membrana externa de *Leptospira* en diferentes sistemas, por mencionar algunos: *ompL1* fue clonado en el plásmido de expresión pMMB66HE (Shang *et al.*, 1995), *lipL32* fue clonado en un adenovirus para su expresión in vivo (Branger *et al.*, 2001) y también fue clonado en un vector para vacuna de ADN (Branger *et al.*, 2005); numerosos estudios se han hecho sobre las proteínas Lig, en uno de los estudios más recientes lograron la clonación

de cinco secuencias que corresponden a formas truncadas de LigA y B de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola en el vector de expresión pTARGET y fueron usados como vacunas de ADN (Forster *et al.*, 2013), entre otras proteínas. Aunado a esto, la secuencia obtenida en este estudio, es idéntica a la reportada por Ordoñez López en el 2010. Con lo anterior, concluyo que la amplificación y clonación de *gspD* es posible en diferentes sistemas.

Expresión de la proteína

En este estudio se logró la transcripción de *gspD* insertado en el plásmido pET11a, sin embargo, no se logró la expresión de la proteína recombinante GspD de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 en *E. coli* BL21 y Rosetta DE3. Korotkov *et al.*, en 2010 empleó *E. coli* BL21 para la expresión, sin embargo, la proteína que expresó corresponde a GspD de *E. coli*, por lo que la diferencia de codones y el uso de chaperonas no representa ningún reto en este sistema. En el 2001, Novy *et al.*, lograron involucrar las secuencias de los ARNt's que codifican para codones raros en *E. coli* en el plásmido pRARE, este plásmido está presente en las células de *E. coli* Rosetta DE3, por lo cual se intentó la expresión de la proteína recombinante en estas células; en este sistema Rodríguez Reyes en el 2007 logró la expresión de GspD de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo, Hardjobovis excluyendo la región que codifica para el péptido señal, sin embargo en este estudio al intentar expresar la proteína completa incluyendo su péptido señal no se logró su expresión. Filoux en el 2004 menciona que GspS es una lipoproteína periférica de la ME que actúa como chaperona para GspD, contribuye a su correcto plegamiento y actividad, la interacción de GspS con GspD cumple dos funciones: es esencial para la inserción de GspD a la ME y protege a la secretina contra la degradación proteolítica, se ha demostrado que PulS (la chaperona de *Klebsiella oxytoca*), puede proteger a OutD (la secretina de

Erwinia chrysanthemi), de la proteólisis en *E. coli*. Korotkov y colaboradores (2013), mencionan que las hélices que conforman a GspS en *E. coli* (EHEC), forman una muesca que corresponde al sitio de unión observado en proteínas homologas, los residuos que forman la muesca son conservados entre homólogos; al mismo tiempo, GspS en diferentes especies pueden tener una estructura totalmente diferente pese a que tienen funciones en común. La vida media de una proteína dentro de la célula depende principalmente en que tan rápido es degradada por proteasas, la presencia de ciertas regiones de 10 a 60 aminoácidos que son ricos en prolina (P), glutamato (E), serina (S) y treonina (T), secuencias conocidas como PEST, crea dominios que son reconocidos por enzimas proteolíticas. Para mejorar la producción de una proteína recombinante la alteración de la secuencia N-terminal, remover secuencias PEST o expresar la proteína recombinante con una chaperona puede ayudar a que la proteína se pliegue correctamente y no sea fácilmente degradada (Clark and Pazdernik, 2009). Los primeros 60 aminoácidos de GspD (incluyendo el péptido señal) contiene un 5% de P, 5% de E, 13% de S y 10% de T; aunado a esto, las propiedades físico-químicas de esta proteína determinaron una vida media de 10 horas en *E. coli*, esta determinación fue hecha con el programa CLC Main Workbench 6.8. Considerando lo anterior, concluyo que el uso de codones no interfiere en la expresión de GspD de *Leptospira* en *E. coli* BL21, la modificación de la región amino, como la eliminación de la región codificante del péptido señal, disminuyen la probabilidad de que la proteína sea degradada rápidamente, o en su defecto, para lograr la expresión del gen completo *gspD* (incluyendo la secuencia codificante para el péptido señal) de *Leptospira* en *E. coli*, es necesario emplear sistemas que incluyan una chaperona que proteja de la degradación proteolítica a la proteína recombinante, como en el sistema pET SUMO, en el cual se genera la expresión una proteína quimérica compuesta por la proteína de interés unida en

su región amino a la proteína sumo con función de chaperona, esta última cuenta con una etiqueta de histidinas para la purificación de la proteína quimérica; este sistema cuenta con una enzima denominada sumasa, la cual libera a la proteína de interés de la proteína sumo.

Epítopes

La identidad de *gspD* de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 con otras serovariedades de la misma especie es del 99% (Lai cepa 46601 y Copenhageni cepa Fiocruz), al ser comparado con otra especie la identidad es del 82.17%, resultados similares son obtenidos cuando evaluamos la secuencia de aminoácidos de GspD, estos resultados concuerdan con los reportados por Rodríguez Reyes en el 2007 y por Ordóñez López en el 2010. Al comparar la secuencia de GspD de *Leptospira* con la de *E. coli*, la identidad total encontrada fue de 25.23%, resultado similar al reportado por Ordóñez López en el 2010. Se confirmó que la proteína tiene una longitud de 596 aa, tiene un peso de 66.494 kDa, un punto isoeléctrico de 8.66, Rodríguez Reyes (2007), menciona que las secretinas tienen una longitud en la cadena de aminoácidos y un peso molecular diferente entre géneros bacterianos.

En el análisis *in silico* de GspD, también se predijeron las regiones hidrofóbicas de la proteína, logrando determinar dos regiones importantes, una localizada en la región amino que corresponde al péptido señal y otra alrededor del aminoácido 300, la cual correspondió a una hélice transmembranal. Además, se determinó que posee una región extracelular en la región amino y una región citoplásmica en la región carboxilo, esta última predicción no concuerda con lo reportado por Reichow *et al.*, en 2010, quien menciona que los dominios periplásmicos (N0 al N3) de GspD de *Vibrio cholerae* se encuentran en la región amino de la proteína precediendo a la región carboxilo de la proteína en la que se

encuentra el dominio de la secretina que corresponde a la parte extracelular de la proteína, este dominio también fue ubicado en la región carboxilo de GspD de *Leptospira*, este dominio contiene los segmentos más conservados de la súper familia de las secretinas involucrada en sistemas de transporte de grandes substratos a través de la membrana externa, ya que con este segmento se forma el poro en la membrana externa (Martin *et al.*, 1993; Linderoth *et al.*, 1996; Koster *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 2001; Korotkov *et al.*, 2011), aunado a esto, esta región de GspD no posee regiones hidrofóbicas.

Basado en el análisis de GspD, considerando sus características físico-químicas y estructurales, en conjunto con las evidencias presentadas por Reichow *et al.* (2010) y Korotkov *et al.* (2011), concluyo que la región carboxiterminal de la secretina GspD de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 es la fracción inmunodominante, ya que la región carboxiterminal de la proteína comprende el dominio funcional de la secretina (ubicado entre los aminoácidos 394 y 558), es la región expuesta de la proteína, y comprende dos regiones inmunodominantes determinadas con base en el análisis de los resultados obtenidos con los programas BcePred (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>) y ABCPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>) (Figura 34), aunado a esto, no hay región hidrofóbica en esta parte de la proteína.

Perspectivas

En el presente estudio se logró la identificación del dominio funcional de GspD, ubicado en la región carboxilo de la proteína (aminoácidos 394 al 558), podría realizarse la clonación y expresión de esta región con la finalidad de evaluar su capacidad inmunogénica y protectora. Aunado a esto, basado en el análisis *in silico* de GspD, en la determinación de regiones inmunogénicas y epítopes B lineales, se propusieron dos secuencias de péptidos que se encuentran dentro del dominio funcional (ubicado entre los aminoácidos 394 al 558), las cuales pueden ser sintetizadas para ser usadas como inmunógenos:

Secuencia péptido 3:

405- PQVLTVDNQEAEISVGQDVPVRTQSRNAGTGGTNAVTVDNYEYRPTGIKL
KFTPHVNK -462 (58 aminoácidos).

Secuencia péptido 4:

505- SIVIGGLISNDKQKRIIKIPFLGDIPYLGHLFKRTTEKIKKTNLMVFITPHILDS
RETADKMTVK -569 (65 aminoácidos).

Al ser utilizados, el dominio funcional y los péptidos propuestos en la producción de anticuerpos policlonales en conejos, se logrará apreciar la localización de estas regiones de GspD en la ME de *Leptospira interrogans* empleando la técnica de inmunofluorescencia a partir de suspensiones de cultivos de *Leptospira* en SSF.

Lo anterior proporcionará información suficiente que permita inferir que estas regiones son expuestas y se encuentran al alcance de los anticuerpos, con lo cual, será factible realizar un ensayo de inmunización empleando el dominio funcional y los péptidos sintéticos como antígenos, además de que la cepa virulenta LOCaS46 de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola servirá para el desafío en el modelo hámster.

VI. REFERENCIAS

1. Alcaraz Sosa. Detección de la expresión de la secretina GspD_L, del sistema de secreción tipo II (T2S) de *Leptospira* mediante inmunohistoquímica (tesis de maestría en ciencias). México, D. F.: UNAM, 2008.
2. Bolin C, Zuerner R, Trueba G. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type hardjobovis on type hardjobovis infection of cattle. Am. J. Vet. Res. 1989; 50:2004-2008.
3. Boom R, Sol C, Salimans M, Jansen C, Wertheim-Van Dillen P, Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 1990; 28:495-503.
4. Branger C, Chatrenet B, Gauvrit A, Aviat F, Aubert A, Bach JM, André-Fontaine G. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. Infect Immun. 2005; 73:4062-4069.
5. Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjkowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A, André-Fontaine G, Eloit M. Identification of the hemolysin-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. Infect Immun. 2001; 69:6831-6838.
6. Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. Int J Syst Bacteriol. 1999; 49:839-858.

7. Brooks GF, Botel JS, Morses A. Microbiología Medica de Jawets. Melnick y Adelberg. 18^a ed. México: El manual Moderno, 2004; 332-336.
8. Bulach D, Zuerner R, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen P, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Ait D, Peterson-Burch B, Coppel R, Rood J, Davies J, Adler B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. PNAS 2006; 103:14560-14565.
9. Chassin C, Picardeau M, Goujon JM, Bourhy P, Quellard N, Darche S, Badell E, d'Andon MF, Winter N, Lacroix-Lamande S, Buzoni-Gatel D, Vandewalle A, Werts C. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. J Immunol. 2009; 183:2669-2677.
10. Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Moller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. Infect Immun. 2007; 75:2441-2450.
11. Clark D, Pazdernik N. Biotechnology: Applying the genetic revolution. Elsevier Inc. 2009; 10:1023-1074.
12. Collins RF, Davidsen L, Derrick JP, Ford RC, Tonjum T. Analysis of the PilQ secretin from *Neisseria meningitidis* by transmission electron microscopy reveals a dodecameric quaternary structure. J Bacteriol 2001; 183:3825–3832.
13. Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. Infect immun. 2002; 70:2311-2318.
14. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis. Australia, Melbourne: MediSci, 1999.

15. Filoux A. The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochem. Biophys. Acta.* 2004; 1694:163-179.
16. Forster K, Hartwig D, Seixas F, Bacelo K, Amaral M, Hartleben C, Dellagostin O. A conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins as a DNA vaccine elicits a prophylactic immune response against leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2013; 20:725-731.
17. Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: Aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scandinavian Immunol.* 2011; 73:408–419.
18. Fronzes R, Christie P, Waksman G. The structural biology of type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiology.* 2009; 7:703-714.
19. González-Pedrajo B, Dreyfus G. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. Mensaje bioquímico, Vol XXVII. Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF. 2003.
20. Haake D, Chao G, Zuerner R, Barnett J, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett P, Bolin C. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun.* 2000; 68:2276-2285.
21. Haake DA, Matsunaga J, Coutinho M, Choy HA, Kelley M, Pinne M, Babbitt J, Lewis MS, Alexio JAG. Leptospiral immunoglobulin-like domain proteins: Regulation and immunoprotection. VII Reunión de la International Leptospirosis Society, Mérida, 2011
22. Inada R, Ido Y, Hoki R, Kakeno R, Ito H. The etiology, mode of infection and specific therapy of Weil's disease (*Spirochaeta icterohaemorrhagiae*) *J Exp Med.* 1916; 23:377–403.

23. Ko A, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 2009; 7:736-747.
24. Korotkov K, Pardon E, Steyaert J, Hol W. Crystal structure of the N-terminal domain of the secretin GspD from ETEC determined with the assistance of a nanobody. *NIH* 2010; 17:255-265.
25. Korotkov K, Johnson TL, Jobling MG, Pruneda J, Pardon E, Hérpux A, Turley S, Steyaert J, Holmes RK, Sandkvist M, Hol WGJ. Structural and functional studies on the interaction of GsoC and GspD in the type II secretion system. *PLoS Pathog*. 2011; 7:e1002228. Doi:10.1371.
26. Korotkov K, Hol W. Crystal structure of the pilotin from the enterohemorrhagic *Escherichia coli* type II secretion system. *Journal of Structural Biology*. 2013; 182:186-191.
27. Koster M, Bitter W, de Cock H, Allaoui A, Cornelis GR, Tommassen J. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol* 1999; 26:789–797.
28. Laguna VAT. Leptospirosis, serie de documentos monográficos. Oficina General de Epidemiología / Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú, 2000.
29. *Leptospira* taxonomy. Taxonomy browser en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=171&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=s> VISITADO EN FEBRERO 2013.
30. Levett PN, Haake DA. *Leptospira* species (Leptospirosis). *Infectious Diseases, Part III Infectious diseases and their etiologic agents*. ELSEVIER, 2009. 240.

31. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:296-326.
32. Linderoth NA, Model P, Russel M. Essential role of a sodium dodecyl sulfate-resistant protein IV multimer in assembly-export of filamentous phage. *J Bacteriol* 1996; 178:1962–1970.
33. Martin PR, Hobbs M, Free PD, Jeske Y, Mattick JS. Characterization of *pilQ*, a new gene required for the biogenesis of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. 1993; 9:857–868.
34. Mena Bañuelos R. Análisis *in silico* de los genes *gspDL* y *gspEL* del sistema de secreción tipo II de *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc (tesis de Maestría en Ciencias). México D.F.: UNAM, 2006.
35. Nally JE, Whitelegge JP, Bassilian S, Blanco DR, Lovett MA. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. *Infect Immun*. 2007; 75:766-773.
36. Nascimento A, Almeida V, Van Sluys M, Monteiro-Vitorello B, Camargo L, Digiampietri L, Harstkeerl RA, Ho P, Marques M, Oliveira M, Setubal J, Haake D, Martins E. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz Jour Med Biol Res*. 2004; 37:459-478.
37. Noguchi H y Kligler IJ. Experimental studies on yellow fever occurring in Merida, Yucatan. Laboratories of the Rockefeller Institute for Medical Research. *J Exp Med*. 1920; 32:601-625.
38. Novy R, Drott D, Yaeger K, Mierendorf R. Overcoming the codón bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *innovations*, Newsletter of Novagen, INC. 2001; 12:1-3.
39. Núñez Carrera. Establecimiento de un ensayo de inmunoprotección basado en rGspD de *Leptospira borgpetersenii* (Hardjobovis) en hámsteres (tesis de Maestría en Ciencias). México D.F.: UNAM, 2009.

40. Ordóñez López. Comparación de la organización genética de los loci *gsp* en 2 cepas de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola (tesis de Maestría en Ciencias). México D.F.: UNAM, 2010.
41. Palaniappan RUM, McDonough SP, Divers TJ, Chen CS, Pan MJ, Matsumoto M, Chang YF. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. *Infect immun.* 2006; 74:1745-1750.
42. Palmer T, Berks B. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nature Reviews Microbiology.* 2012; 10:483-496.
43. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJm Leonard FC. *Veterinary microbiology and microbial diseases.* E. U. A. Blackwell PublisHind. 2002; 175-179.
44. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. *Medicina Veterinaria.* 10^{ma} ed. ELSEVIER, 2006.
45. Reichow SL, Korotkov KV, Hol WGJ, Gonen T. Structure of the cholera toxin secretion channel in its closed state. NIH public Access, *Nat Struct Mol Biol.* 2010; 17:1226-1232.
46. Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RD, Santana FS, Mohr S, Melendez AX, Queiroz A, Santos AC, Ravines RR, Tassinari WS, Carvalho MS, Reis MG, Ko A. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PKoS.Neg1. Trop. Dis.* 2008; 2:e228.
47. Ren S, Fu G, Jiang X, Zeng R, Miao Y, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu L, Jiang H, Jia J, Tu Y, Jiang J, Gu W, Zhang YQ, Cai Z, Sheng H, Yin H, Zhang Y, Zhu G, Wan M, Huang H, Qian Z, Wang S, Ma W, Yao Z, Shen Y, Qiang B, Xia Q, Guo X, Danchin A, Saint G, Somerville R, Wen Y, Shi M, Chen Z, Xu J, Zhao G. Unique physiological and

- pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2003; 422:888-893.
48. Rodríguez Reyes. Antigenicidad de la proteína de membrana externa GspD_L, la supuesta secretina del SST2S de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis) (tesis de Doctorado en Ciencias). México D.F.: UNAM, 2007.
49. Saito M, Villanueva S, Kawamura Y, Iida K, Tomida J, Kanemaru T, Kohno E, Miyahara S, Umeda A, Amako K, Gloriani N, Yoshida S. *Leptospira idonii* sp. Nov., isolated from environmental water. *IJSEM*, 2013; 63:2457-2462.
50. Sandkvist M. Type II secretion and pathogenesis. Minireview *Infect Immun*. 2001; 6:3523-3535.
51. 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. *Infect Immun*. 1995; 63:3174-3181.
52. Terpstra W J. Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization e International Leptospirosis Society. Malta, 2003.
53. Varela G, Avendaño E, Velasco R, Zárate Aquino MI. Estudio serológico de leptospirosis en la República Mexicana. *Rev Invest Salud Pública*. 1972; 32:53-57.
54. Weil A. Ueber eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende acute Infectionskrankheit. *Deutsche Archive für Klinische Medizin*. 1886; 39:209.
55. WHO. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *Wkly. Epidemiologia. Rec*. 2011; 86:45-50.

56. Yang C. Leptospirosis renal disease: Understanding the initiation by Toll-like receptors. *Kidney International*. 2007; 72:918–925.
57. Zunino E y Pizarro R. Leptospirosis. Puesta al día. *Rev Chil Infect* 2007; 24:220-226.

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

min = minutos

seg = segundos

°C = Grados centígrados

µg = Microgramos

µl = Microlitros

µm = Micrómetros

ADN = Ácido desoxirribonucleico

CaCl₂ = Cloruro de Calcio

cADN = ADN complementario

D.E. = Destilada y esterilizada

DEPC = dietil pirocarbonato

EDTA = ácido etilendiaminotetraacético

EMJH = Ellinghausen y McCullough modificado por Johnson y Harris

g = Gramo

GrILLeP = Grupo de Investigación en *Leptospira* y Leptospirosis

gsp = Sistema general de secreción

hrs = Horas

IPTG = isopropil- β -D-tiogalactósido

kDa = Kilodaltons

LB = Luria Bertani

M = Molar

ME = Membrana externa

mg = Miligramo

MI = Membrana interna

ml = Mililitro

mM = Milimolar

ML= Marcador de longitud de ADN λ *Bst*EII;

ng = Nanogramos

nm = Nanómetros

PAMPs = Patrones moleculares asociados a patógenos

pb = Pares de bases

PCR = Reaccion en cadena de la polimerasa

pH = Potencial hidrógeno

PME = Proteínas de membrana externa

PVDF = fluoruro de polivinilideno

ARN = Ácido ribonucleico

rpm = revoluciones por minuto

RT = Transcriptasa reversa

T.A. = Temperatura ambiente

T2S = Sistema de secreción tipo 2

T3S = Sistema de secreción tipo 3

TLR = Receptor tipo Toll

TNF α = Factor de necrosis tumoral alfa

U = Unidades

X g = Gravedades

XGal = 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Apéndice 1

Cuadro 13 Inducción de la expresión de la proteína en BL21 a una absorbancia de 0.35

	HORA DE LECTURA A UNA OD ₆₀₀										
Muestra	0	1	1.5	2	3	4	5	6	6.5	7	8
IFN γ	0.29	0.528	0.627	0.726	1.035	1.449	1.725	1.869	1.87	1.939	1.94
GspD	0.35	0.5	0.448	0.396	0.42	0.698	1.39	1.818	1.837	1.934	2.002

Cuadro 14 Inducción de la expresión de la proteína en BL21 a una absorbancia de 0.6

	HORA DE LECTURA A UNA OD ₆₀₀														
Muestra	0	1	2	02:15	02:25	02:35	03:35	04:35	05:35	06:35	07:35	08:35	09:35	10:35	*T.N.
IFN γ	0.017	0.055	0.249	0.363	0.416	0.521	0.755	0.948	1.069	1.148	1.217	1.232	1.265	1.277	1.379
GspD	0.018	0.056	0.3	0.415	0.481	0.609	0.844	1.018	1.059	1.072	1.037	0.992	1.032	1.103	1.747

Cuadro 15 Inducción de la expresión de la proteína en BL21 a una absorbancia de 1

	HORA DE LECTURA A UNA OD ₆₀₀											
Muestra	0	3	03:20	03:30	1	2	3	4	5	6	7	*T.N.
IFN γ	0.019	0.653	0.815	0.925	1.176	1.351	1.432	1.505	1.509	1.488	1.45	1.632
GspD	0.015	0.778	0.961	1.05	1.266	1.37	1.431	1.467	1.452	1.391	1.388	1.67

*T.N. Toda la Noche

Cuadro 16 Inducción de la expresión de la proteína en Rosetta DE3 a una absorbancia de 0.5

	HORA DE LECTURA A UNA OD ₆₀₀											
Muestra	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	*T. N.	
GspD c/ IPTG	0.195	0.24	0.484	0.792	0.997	1.126	1.29	1.339	1.383	1.428	1.698	
GspD s/IPTG	0.19	0.276	0.479	0.731	1.066	1.253	1.342	1.426	1.48	1.575	1.778	
Rosetta	0.188	0.266	0.48	0.827	0.995	1.16	1.28	1.425	1.49	1.561	1.842	

*T. N.: Toda la noche

Apéndice 2.

Cuadro 17 Iniciadores empleados para la PCR

INICIADOR	SECUENCIA 5' → 3'	OBSERVACIONES
P11F	CATATGTCCGGAACAATCAGTC AAC	Iniciador adelantado para la amplificación del <i>gspD</i> , tiene un sitio de corte para la enzima <i>NdeI</i> (CA_TATG).
P11R	GGATCCTTAGTGGTGGTGGTGG TGGTGATCCCCTCTTTCTCTG	Iniciador reverso para la amplificación del <i>gspD</i> , tiene un sitio de corte para la enzima <i>BamHI</i> (G_GATCC) y posee una etiqueta de 6 Histidinas.
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT	Iniciador universal adelantado que flanquean el sitio de clonación en el vector T
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	Iniciador universal reverso que flanquea el sitio de clonación en el vector T
pET11aF	GTGAGCGGATAACAATTCCC	Iniciador adelantado que flanquea el sitio de clonación en pET11a
pET11aR	CCTCAAGACCCGTTTAGAGG	Iniciador reverso que flanquea el sitio de clonación en pET11a

Secuencia de nucleótidos de *gspD* (*Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46).

> LOCaS46 1791 bp

```
ATGTCCGGAACAATCAGTCAACTTTCAATCTTTAGAATATTCTCCCTTCTCATACTTTTG
TTTTTAGTATGGGACAAACCAGTCTTTCCTCAAAGTAAGAAAAAACTTCCGCAAAGACA
AAATCGGTTACTCAAGAAGAACCTTTCGGAAAAAACTTTCTATGCAAATTGGAGAGATACA
GAACTAAACGACTTTCTCAAAGGAATGAGCGCCATTTTAAAGAAAAATATTCTTTTAGAT
GAAAGTTTAAAAGGTAAAAAATTACGATCATTCTCAAAGGAAATTCCGATCAAAAAT
GGATTTATCTTTATGAAATCTGTTTTAGAATCCCTAGGTTTCGGAGTAGTAGAAGAACCG
GATCTCATTTTCGATTGTTAAAATTAAGATGCGCTTGCTAGATCTCCTATCGTTAGGGTC
GGAAAAGAATTGATTCCCGAAGAGGAAGTTGGAGATTATAGAACGATTACTCAGGTCATT
CCTATTGAAAATGTAAAACCAGAAGAATTAGAACCCTATTTTAAAACGTCTTACTTCTCCT
AATACGGATGTGATCGTTTATAGAAATACAAATACGATTGTACTTTCAGGTTCCGCCGCA
GACATCAATAAATTGTTGGTACTTGTAAAGCGAATTTGACGTCAAATCGAAGAGGCGACT
CCAGGATCGATTTTCATCGGCAGGTGATATTCATATTTATACTTTGGAATACAGTGAGGCT
GAAAAAATCGCGGCGACTTTAGTTAAGTTAGACAATCCTGTGATTGAGTCTGAAGATCTG
AGTTCTGAAAGAAAGCCTCCACCGCCAGGGCAACCTATGCCTAAGGTAGATAAGATCAAG
GCGGTTGGCCATAAAGAATCCAATTCTGTGATTGTTACGGCGACAAATGCGGAATGGGCA
GAAATCCGTAAAAATCATTAAGGTTTTGGATTGAGCTAGAAAACAGGTTTTATTAGAAGTT
TTGATCGTGGAACCTTACTTCCAGCGATTTAAACGATTTTCGGGATCGATTGGAGATATAAG
GGGGAAGCTTTTCGGTCAATTCAATTCTGGTCTTTCTAAAGAAGCGAATATTATCAATTTCG
AACGGTCAGGTCAATCCGAACATAAACACTCTGAGTGGTTTTCTCTTTAGGATTTTTAAAA
GCTGGTTTCGGAACAAATCATAGGAATTTTAAGCGCCAATCAAGGAAATGAAAACTTTAAAC
GTGTTATCTGCTCCTCAAGTGCTTACAGTAGATAATCAAGAAGCAGAAATCAGTGTGGGT
CAAGACGTGCCCCGTTTCGAACTCAGAGTAGGAACGCAGGTACTGGTGGAACGAACGCTGTA
ACCGTGGACAATTACGAATATCGTCCTACTGGTATCAAACCTAAGTTTACTCCTCACGTG
AACAAAAATAATAAGATCACTCTCGAACTCTTTCAGGAGATTAATAATATCGCAGAGATT
GCTCTCGCCGGAGGAAACCCTACTTTCAATCGAAGAGAAATTAAACTTCTATCTCAATT
GAAAACACTCAATCTATCGTGATCGGTGGATTGATTTTCGAACGATAAACAAAAAAGAATC
ATTAAAATTCCTTTTCTAGGAGACATTCGGTATTTAGGTCATCTTTTTTAAAAGAACTACT
GAAAAAATTA AAAAGACCAACTTGATGGTTTTTTATTACGCCGCATATACTCGATAGTAGA
GAGACTGCGGATAAGATGACTGTTAAGAAAAAAATGCAGCAAGAACGTTACGAACTCGAG
AGAGAAAGAATCCTCAACAAAGAAAGAGAAATCAGAGAAAGAGGGGATTAA
```

Secuencia de aminoácidos de GspD (*Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46).

>LOCaS46 596 aa

MSGTISQLSIFRIFSLILLFLVWDKPVFPQSKKKTSAKTKSVTQEEPSEKTFYANWRDT
ELNDFLKGMSAILKKNILLDESLKGKKITIIISQKEIPIKNGFIFMKSIVLESLGFGVVEEP
DLISIVKIKDALARSPIVRVGKELIPEEEVGDYRTITQVIPIENVKPEELEPILKRLTSP
NTDVIVYRNTNTIVLSGSAADINKLLVLVSEFDVKIEEATPGSISSAGDIHIYTLEYSEA
EKIAATLVKLDNPVIQSEDLSSERKPPPPGQMPKVDKIKAVGHKESNSVIVTATNAEWA
EIRKIIKVLDSARKQVLLLEVLIVELTSSDLNDFGIDWRYKGEAFGQFNGLSKEANIINS
NGQVNPNTLSGFSLGFLKAGSEQIIGILSANQGNENFNVLSAPQVLTVDNQEAEISVG
QDVPVRTQSRNAGTGGTNAVTVDNYEYRPTGIKLFKTPHVNKNNKITLELQEIKNIAEI
ALAGGNPTFNRREIKTSISIENTQSIVIGGLISNDKQKRIKIPFLGDIPLYLGHFKRTT
EKIKKTNLMVFITPHILDSRETADKMTVKKKMQQERYELERERILNKEREIRERGD*