



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EFFECTO PROTECTOR DE GspD RECOMBINANTE DE *Leptospira interrogans* COMO VACUNA ORAL EN  
HÁMSTERES

TESIS

PARA OPTAR EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

**NERY LÓPEZ GONZÁLEZ**

TUTOR PRINCIPAL

**ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

COMITÉ TUTORAL

**ALFREDO SAHAGÚN RUIZ**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

**JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE SALUD Y DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, 2016



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.

## RESUMEN

Leptospirosis es una enfermedad causada por bacterias patógenas del género *Leptospira*. Es una enfermedad que afecta prácticamente a todos los mamíferos y tiene una distribución mundial. En humanos se presentan más de 500 000 casos nuevos leptospirosis severa al año. Tiene gran variedad de signos clínicos que van de clínicamente sanos, con alteraciones sistémicas renales, respiratorias, reproductivas, dermatológicas y neurológicas, hasta complicaciones graves como son: hemorragias pulmonares, insuficiencia renal y falla hepática. Los roedores son los principales diseminadores que causan leptospirosis humana. La prevención de la enfermedad ha sido mediante bacterinas, las cuales tienen la limitante de ser serovariedad específica y un periodo de protección relativamente corto. Estudios de proteómica identificaron a la proteína del sistema T2S. Este sistema contiene un conjunto de proteínas entre las que se encuentra GspD, esta es una proteína de membrana externa que consta de un anillo dodecamérico. Esta proteína es abundante, funcional, está expuesta, es antigénica y tiene una alta homología entre serovariedades patógenas. Se han probado recientemente vacunas orales teniendo alta efectividad en la prevención contra patógenos como *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* serovariedad Typhi y *Borrelia burgdorferi*. Al utilizar vacunas orales se tiene la ventaja de inmunizar de manera masiva a animales diseminadores. En este estudio se expresó la proteína GspD de *Leptospira interrogans* Serovariedad Canicola cepa LOCaS46 de manera recombinante en *E. coli* BL21 DE3 inducida con IPTG y utilizando como vector el plásmido pET28a. Se vacunaron de manera oral hámsteres Sirio Dorado de 6 a 8 semanas de edad de ambos sexos con una dosis baja de 37mg y una dosis alta de 148mg de dosis total de proteína GpsD.

Se administró cultivo vivo de *E. coli* BL21 DE3 recombinante expresando GspD de *L. interrogans*, divididas las aplicaciones en 20 dosis durante 4 semanas. Se utilizó mermelada de fresa mezclada con el cultivo para ser palatable. Posteriormente los hámsteres se desafiaron inoculando con una cepa virulenta de *L. interrogans* Serovariedad Canicola cepa LOCaS46 a los hámsteres vacunados con una dosis de 400 leptospiras en 100  $\mu$ L de medio EMJH vía intravazones. De los animales vacunados murieron más del 80%, lo que indica que no se logró la protección contra la infección ni la enfermedad.

Palabras Clave: *Leptospira*, vacuna oral, vacunación

## INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
Historia.....	1
Epidemiología.....	3
Clasificación de <i>Leptospira</i> .....	4
Biología de <i>Leptospira</i> .....	4
Metabolismo.....	5
Patogenia.....	5
Tratamiento.....	6
Vacunas actuales contra leptospirosis.....	7
Respuesta inmune contra <i>Leptospira</i> .....	7
Membrana externa de <i>Leptospira</i> .....	9
Proteínas de membrana externa.....	9
LipL32.....	10
Loa22 y otras proteínas similares a OmpA.....	10
Familia lig de lipoproteínas de membrana externa.....	10
Porina OmpL1.....	11
Sistema de secreción bacteriana.....	11
Sistema de secreción tipo II.....	13
GspD La secretina.....	14
Vacunas orales.....	15
Antecedente de vacunación oral con LigA.....	16
JUSTIFICACIÓN.....	17
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
Objetivos particulares.....	17
MATERIAL Y MÉTODOS	
PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.....	18
RECUPERACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS RECOMBINANTES.....	18
ESCRUTINIO DE COLONIAS RECOMBINANTES MEDIANTE PCR.....	19
ESCRUTINIO DE BACTERIAS RECOMBINANTES MEDIANTE	
EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO.....	19
DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	20
CONSERVACIÓN DE LAS COLONIAS RECOMBINANTES.....	20
PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA.....	20
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	21
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA SDS.....	21
ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNA.....	22

	INMUNODETECCIÓN TIPO WESTERN.....	22
	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA.....	23
	PREPARACIÓN DE LA VACUNA.....	23
	VACUNACIÓN ORAL.....	23
II.	RESULTADOS	
	PCR DE BL21 RECOMBINANTE.....	25
	DIGESTIÓN DE PLÁSMIDO.....	26
	INMUNODETECCIÓN TIPO WESTERN DE GspD.....	27
	PESO DE LOS HÁMSTERES DURANTE LA VACUNACIÓN Y DESAFÍO.....	28
	AGLUTINACIÓN MICROSCÓPICA.....	29
III.	DISCUSIÓN.....	23

## INTRODUCCIÓN

### HISTORIA

La leptospirosis ha existido probablemente por milenios, sin embargo, es difícil de llegar a una conclusión hasta antes de los reportes de la medicina moderna. Es claro que al menos uno de los brotes de enfermedad descritos por textos antiguos fue por leptospirosis. Escritos antiguos chinos dan cuenta de “La ictericia de los arrozales, mientras que en Japón la leptospirosis se conocía como “La fiebre de autumn o de los 7 días”. En Europa, Australia y otras regiones la asociación fue reconocida entre enfermedades ocupacionales febriles y ocupacionales particulares dando lugar a síndromes como: enfermedad de los cortadores de caña, enfermedad de las porquerizas y enfermedad del pantano o barro. La leptospirosis fue reportada más tarde en Rusia como fiebre amarilla infecciosa de Ganado provocada por *L. interrogans* serovariedad Canicola cepa Hond Utrecht IV (1).

El primer reporte de leptospirosis icterica con insuficiencia renal fue reportado hace más de 100 años por Adolf Weil en Heidelberg (2). Fue reconocida como una enfermedad ocupacional en cosechadores en China y Japón llamado akiyami o fiebre de autumn que persiste hasta la fecha. En retrospectiva hay clara descripción de leptospirosis icterica hasta finales del siglo XIX. Se ha sugerido que *Leptospira interrogans* Serovariedad Icterohaemorrhagiae fue introducido en el este de Europa en el siglo XVIII, partiendo desde Asia coincidiendo con el rango de distribución de *Rattus norvegicus*. La leptospirosis fue demostrada independientemente en Japón por Inada e Ido que detectaron espiroquetas y anticuerpos específicos en sangre de mineros japoneses con ictericia infecciosa (2). Otros grupos de médicos alemanes estudiaron a soldados afectados por la enfermedad francesa en las trincheras del noreste de Asia.

Hubener y Reiter detectaron espiroquetas en sangre de cerdos de guinea inoculadas con sangre de soldados infectados. Posteriormente, Stimson demostró por tinciones de plata la presencia de grupos de espiroquetas en túbulos renales de pacientes muertos reportados como muertos por fiebre amarilla. Las espiroquetas tienen ganchos al final que Stimson nombró como *Spirochaeta interrogans*, por su semejanza a un signo de interrogación. Desafortunadamente esta observación fue pasada por alto por muchos años (1). La importancia de las ratas como fuente de infección humana fue descubierta en 1917. Mientras que el potencial de la enfermedad de *Leptospira* en perros fue reconocido, pero el poderla distinguir claramente entre infección por *L. interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae y Canicola tomó varios años. La leptospirosis en ganado fue reconocida varios años después (2). En los años 50's Wolff y Broom agruparon a la bacteria según las diferencias antigénicas en serotipos y serogrupos así como la diferenciación entre las 2 principales especies: *L. interrogans* para los especímenes patógenos, *L. biflexa* para los no patógenos (3). Para la década de 1980 la leptospirosis fue documentada como una enfermedad veterinaria de mayor importancia económica en perros, bovinos, cerdos, caballos y ovejas (1).

En México el primer reporte de leptospirosis fue hecho en pacientes en Mérida, Yucatán que originalmente habían sido diagnosticados con fiebre amarilla, hasta hacer el aislamiento de la bacteria que probó ser leptospirosis (4)(5). Una variedad de reportes durante 1920 y 1990 muestran la prevalencia de la enfermedad en el sureste del país. En 2007 en Veracruz se reportó la mayor incidencia de leptospirosis. En otro reporte entre 2000 y 2010 se exhibe una mayor distribución dentro del país (5).

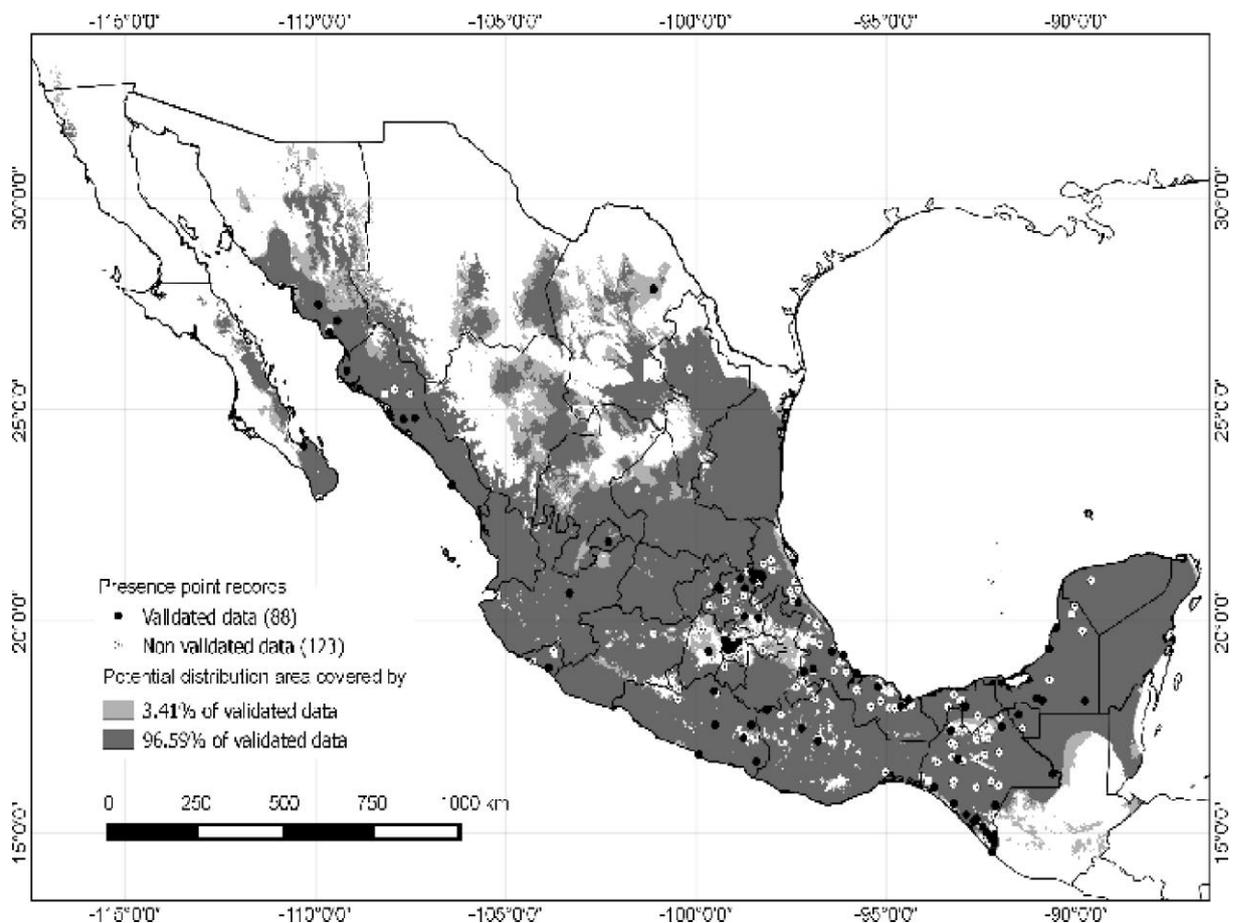


Figura 1. Mapa que muestra la presencia de casos y potencial distribución de leptospirosis en México. La potencial distribución del nicho ecológico fue hecha con un modelo basado en casos validados. Los puntos negros muestran las localidades de casos validados de leptospirosis, los puntos brillantes muestran los casos no validados (casos probables y muertes que se agruparon como casos desconocidos). Los tonos grises muestran los 2 umbrales usados para determinar la distribución potencial de la enfermedad. El gris oscuro muestra el umbral de 95.6% del mejor subconjunto. En los tonos grises claros muestra los 3.4 % de datos validados considerados como posibles errores (5).

## EPIDEMIOLOGÍA

Las leptospirosis patógenas son ampliamente distribuidas en la naturaleza y se mantienen en los riñones de varios hospederos silvestres y domésticos. El ciclo de *Leptospira* involucra diseminación por orina, persistencia en el medio ambiente, adquisición de un nuevo hospedador y diseminación hematogena hacia los riñones a través del glomérulo o por los vasos capilares peritubulares; una vez que accede al lumen de túbulos renales, estas colonizan los bordes de cepillo del epitelio del túbulo contorneado proximal, del cual se esparcen por

orina. Puede persistir por largos periodos en el huésped reservorio sin causar signos de enfermedad (1).

La transmisión de la enfermedad es reconocida como un riesgo ocupacional en industrias relacionadas con la agricultura, ganadería, minería y resultado de contacto directo con orina o agua contaminada con orina de animales infectados. Otras maneras comunes de transmisión son: durante actividades recreativas, eventos acuáticos, natación, viajes de aventura a través del contacto o ingestión de agua contaminada con orina de animales infectados. Algunos brotes se han asociados con inundaciones en áreas urbanas y rurales. Es importante mencionar que se ha aislado tanto *Leptospiras* patógenas como saprófitas de ríos y lagos, además son capaces de sobrevivir en suelo húmedo y agua fresca por largos periodos. La mayoría de comunidades urbanas colectan agua de cuerpos de agua naturales como ríos, arroyos o mantos de acuíferos subterráneos. Alrededor del mundo ha habido brotes en áreas donde las condiciones sanitarias son pobres (1).

Se estima que al año se presentan en el mundo 300,000 - 500,000 nuevos casos de leptospirosis aguda en humanos, con brotes ocurriendo en varios países de Latinoamérica incluyendo México (5).

Leptospirosis ha sido clasificada como una enfermedad infecciosa reemergente. El número actual de pacientes en México es desconocido y las serovariedades de *Leptospira* no siempre son reportados en algunos estados. La magnitud y potencial de riesgo es desconocido (5). Sánchez et al, (2015) encontraron que no hay no hay preferencia en morbilidad según el sexo y que los hombres son más susceptibles a leptospirosis fatal. Además, los índices de fatalidad en México son más altos que en Barbados, Marruecos, Alemania, Trinidad y Tobago

y Hawái en Estados Unidos. En la última década, la morbilidad de la enfermedad ha incrementado posiblemente debida a la búsqueda de pacientes con dengue por contingencias medioambientales debidas a ciclones y huracanes. Otra razón del incremento de número de casos es que 17 laboratorios estatales fueron certificados para el diagnóstico de leptospirosis, lo cual incrementó el número de muestras. En 2010 disminuyó el número de muertes posiblemente por el diagnóstico oportuno de la enfermedad (5).

### **CLASIFICACIÓN DE *Leptospira***

El agente etiológico de leptospirosis es una bacteria del phylum *Spirochaetes*; clase *Spirochaetes*; orden *Spirochaetales*; familia *Leptospiraceae*; género *Leptospira* (2).

*Leptospira* se clasifica por sus características antigénicas y además por sus características genotípicas (2). Hasta antes de los años 90's *Leptospira* se dividía en 2 especies: *L. interrogans* que comprendía todas las cepas patógenas y *L. biflexa* que comprendía las cepas saprófitas medioambientales. *L. biflexa* desarrolla en presencia de 8-azaguanina a 13°C (3). Todas las especies reconocidas de *Leptospira* se categorizan en 24 serogrupos y más de 250 serovariedades. El lipopolisacárido (LPS) de *Leptospira* es el antígeno principal, el cual es aglutinante y es reconocido por anticuerpos específicos que favorecen la fagocitosis (7,8). El LPS es la base para clasificación serológica dependiendo de la similitudes probablemente debida al arreglo de sus carbohidratos (3). La clasificación genética en contraste está basada en la homología de las secuencias del DNA del microorganismo (9). En la actualidad hay al menos 19 especies; 13 patógenas, 6 saprófitas. 7 de estas especies son principales

causales de leptospirosis: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. kirschneri* y *L. alexanderi* (8).

## **BIOLOGÍA DE *Leptospira***

El nombre *Leptospira* deriva del griego: leptos= estrecho y espira= en forma de espiral (10). Tiene un cuerpo en forma de espiral con una medida de 0.1  $\mu\text{m}$  de diámetro, longitud de 6-20  $\mu\text{m}$  y longitud de onda de 0.5  $\mu\text{m}$  (6). Los ganchos característicos al final de los extremos de la bacteria le dan la forma distintiva de signo de interrogación (8). Posee dos flagelos periplásmicos que están localizados en el espacio periplásmico, cada uno comienza a 0.18 nm de final de cada extremo (3). *Leptospira* muestra un movimiento rápido de traslación de 20  $\mu\text{m}$  en 2-3 segundos en medio ordinario (6). *Leptospira* ha demostrado tener un flagelo periplásmico independiente (11). Los filamentos flagelares de *Leptospira* consisten en un complejo donde el filamento constituido por FlaB es el centro y está rodeado por una cubierta flagelar compuesta de FlaA (12). Se han hecho experimentos de mutación sobre el gen *flaB* de *L. biflexa* y estos produjeron una bacteria inmóvil (13). En contraste con bacterias que tienen flagelos externos la capacidad de *Leptospira* paradesplazarse se incrementa en condiciones de alta viscosidad. Esta capacidad ha sugerido incremento en la sobrevivencia de la bacteria en medio ambiente natural y la invasión a tejidos por especies patógenas de *Leptospira* (14).

## METABOLISMO

Las especies de *Leptospira* utilizan como fuente de energía y carbono, ácidos grasos de cadena larga (más de 15 carbonos; en especies patógenas) a través de beta-oxidación, *Leptospira interrogans* es capaz de metabolizar ácidos grasos saturados en presencia de ácidos grasos insaturados, sin embargo, estos ácidos grasos esenciales son tóxicos, por lo cual requiere detoxificantes como albúmina sérica o complejos de sorbitol de ácidos grasos (Tween) para medios de cultivo. La albúmina funciona como absorbente de gran cantidad de ácidos grasos promoviendo su liberación lenta. (3). *Leptospira* spp. es un microorganismo aerobio o microaerofílico (15), además como fuente de nitrógeno para medios de cultivo requiere amonio (3). Este organismo muestra actividad oxidasa fuerte y catalasa negativa o débil en cepas no patógenas, por el contrario oxidasa débil y catalasa fuerte en cepas patógenas (16). Algunos estudios muestran que la expresión de algunas proteínas disminuye, a la par que la virulencia se atenúa en cepas con muchos pases en laboratorio. En *Leptospira interrogans* Serovariedad Lai se ha demostrado que las proteínas involucradas en el metabolismo lipídico son estimuladas en la atenuación de las cepas virulentas (17). Las especies patógenas contienen los genes completos para la biosíntesis de vitamina B12, ausentes en otras espiroquetas como *B. burgdorferi* y *T. pallidum* (18). Otros requerimientos nutricionales incluyen tiamina, biotina (en algunas cepas), fosfato, calcio, magnesio y hierro. Para aislamiento y cultivo de cepas patógenas se requieren de sales de cobre, manganeso y sulfato (6).

## **PATOGENIA**

Las *Leptospiras* patógenas colonizan persistentemente los riñones de animales reservorios silvestres y domésticos, los cuales no presentan signos clínicos y eliminan la bacteria por la orina al ambiente. Esto puede originar muchas veces que infecten a un nuevo hospedador reservorio (1), o un huésped accidental. La vía de entrada de *Leptospira* puede ocurrir a través de lesiones cutáneas como cortes o abrasiones (19), piel reblandecida por agua o a través de mucosas como la conjuntiva, la oral o la genital. La exposición puede ocurrir por contacto directo con animales infectados o contacto con suelo o agua contaminada con orina de animales infectados (1). El segundo paso en la patogenia es la diseminación hematógena (leptospiemia) y persiste durante la primera semana de la infección. La lesión primaria en esta fase es en el endotelio de los vasos sanguíneos pequeños por toxinas o componentes tóxicos celulares aun no identificados. Esto culmina en isquemia de órganos resultando en necrosis tubular renal, hepatocelular, daño pulmonar, meningitis, miositis y placentitis (20).

El 80-90% de los humanos infectados muestran síntomas leves, son siempre huéspedes accidentales y susceptibles a la enfermedad. Al rededor del 10% de infecciones muestran signos clínicos severos como ictericia, insuficiencia renal aguda, ceguera (síndrome de Weil), o síndrome hemorrágico pulmonar agudo.

Con datos de mutagénesis solamente se han identificado 4 factores de virulencia en *Leptospira*; La proteína Loa22, la hemoxigenasa, interruptor proteico del motor flagelar (FliY) y el lipopolisacarido. El potencial endotóxico del lipopolisacarido de *Leptospira* comparado con otras bacterias Gram negativas es bajo, posiblemente debido a las inusuales características del lípido A el cual

contiene un aminoácido extra por cada disacárido, además de tener un solo fosfato metilado (21).

## TRATAMIENTO

Las *Leptospiras* son susceptibles a  $\beta$ -lactámicos, macrólidos, tetraciclinas, fluoroquinonas y estreptomicina (6).

La mayoría de casos de leptospirosis con signos clínicos ligeros se resuelven de manera espontánea por sí solos. El inicio de tratamiento antibiótico temprano en algunos pacientes previene el progreso de la enfermedad a leptospirosis severa. Basado en historia de exposición, factores de riesgo y signos clínicos debería iniciarse tratamiento empírico tan pronto como sea posible. Un resultado negativo no debería ser regla por posibles casos de infección temprana (1). El tratamiento en leptospirosis severa en humanos requiere hospitalización y administración de penicilina intravenosa (1.5 millones de unidades) cada 6 horas, ampicilina intravenosa (0.5-1.0 gramo) cada 6 horas, ceftriaxona intravenosa (1 gramo) cada 24 horas o Cefotaxima intravenosa (1 gramo) cada 6 horas (1). La Cefotaxima ha demostrado no ser inferior que la penicilina para tratamiento de leptospirosis severa (22). Pacientes adultos con leptospirosis severa deberían

recibir también 100 mg de doxiciclina de manera oral 2 veces por día o 500 miligramos de azitromicina 1 vez por día. Cuando la dosis se ajusta según el peso, la azitromicina y amoxicilina puede darse a mujeres embarazadas y niños. Estas recomendaciones son basadas en pruebas de susceptibilidad y vitro (23). El tratamiento con doxiciclina también previene la diseminación del microorganismo por la orina (24).

Las *Leptospiras* patógenas se unen a condroitin sulfato B de células del hospedador. La interacción de *Leptospira* patógena con células endoteliales induce cambios celulares que son consistentes con lesión de barreras endoteliales contribuyendo a la invasión bacteriana. Este proceso, al menos in vitro, puede bloquearse por inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) lisinopril, sugiriéndose como tratamiento complementario al antibiótico para disminuir el daño tisular (25).

## **VACUNAS ACTUALES CONTRA LEPTOSPIROSIS**

La eficacia de las vacunas para prevenir leptospirosis fue demostrada después de que se probó que *Leptospira* era la causante de la enfermedad de Weil en mineros japoneses. Las *Leptospiras* desarrollan en medios de cultivo que contienen suero de conejo o albúmina sérica bovina y pueden ser inactivadas por calor o formalina y lavadas por centrifugación. Las vacunas son administradas inicialmente vía subcutánea con 1.0 mL conteniendo  $2.5 \times 10^8$  *Leptospiras* y posteriormente 1 refuerzo a los 7 días después. La eficacia de la protección con bacterinas ha sido del 60-100% (26). Sin embargo, la efectividad

es únicamente serovariedad específica (3). Estudios han demostrado que la inmunidad inducida por las bacterinas va de 6 meses hasta 1 año, otros reportan una duración de hasta 3 y 7 años en humanos (26). La inmunidad en perros también ha sido controvertida. La variabilidad local de serovariedades endémicas complica el desarrollo de vacunas que pueden ser utilizados alrededor del mundo. Al parecer no hay diferencias entre bacterinas cultivadas con medio de cultivo libre de proteína y con proteína. Además, se ha mencionado que la vacuna de bacteria completa puede inducir uveítis inmunomediada (27). Se han probado vacunas con lipopolisacárido que son capaces de evitar la eliminación de *Leptospira* por orina, pero tienen la misma limitante; serovariedad específica (28). Vacunas con proteínas recombinantes han mostrado protección cruzada entre serovariedades. Entre algunas proteínas se encuentran la OmpL1 y la LipL41, ambas son proteínas expuestas y actúan sinérgicamente para conferir inmunoprotección contra leptospirosis en el modelo del hámster cuando se han utilizado juntas, sin embargo, ninguna protege por separado (29). LipL32 o Hap-1 es la proteína más abundante y presente en infecciones por *Leptospira*. Una recombinante de LipL32 ha sido utilizada para diagnóstico por ELISA con buena sensibilidad y especificidad en leptospirosis humana. Esta proteína no ha conferido protección al parecer por ser una proteína de subsuperficie (30). Las proteínas similares a inmunoglobulinas (LigA y LigB). Se piensa que son adhesinas debido a la función que tienen otras proteínas Lig en *E. coli* y *Y. pseudotuberculosis*. Se propone a las proteínas Lig como candidatos vacunales (26). Una forma lipídica de LigA recombinante, se probó como vacuna oral previniendo contra la infección letal, pero no de la colonización renal (31).

## **RESPUESTA INMUNE CONTRA *Leptospira***

*Leptospira* causa 2 diferentes manifestaciones de la enfermedad dependiendo del hospedador y la serovariedad que la afecta. La infección puede ir de crónica a asintomática y la forma aguda es potencialmente fatal (20,32).

La respuesta inmune innata constituye la primera línea de defensa del hospedador, tiene un papel crucial en el reconocimiento y eliminación de agentes infecciosos (33). Se ha visto que las leptospiras patógenas especialmente si son virulentas, resisten en suero a la acción del complemento, por el contrario, leptospiras saprófitas mueren en pocos minutos en presencia de suero humano normal (34). El lipopolisacárido de *Leptospira* estimula una fuerte respuesta de anticuerpos durante la infección o como resultado de vacunación con bacterinas completas. El LPS de las demás bacterias Gram (-) es detectado mediante receptores tipo toll 4 (TLR4), sin embargo, el LPS de *Leptospira* en humanos es detectado con el TLR2 y el TLR1 (34). En murinos el LPS es reconocido principalmente por el TLR2, pero el TLR4 también contribuye a la activación celular (35). Los ratones de la cepa C3H/HeJ con función disminuida de TLR4, son susceptibles a la infección letal, lo que indica la importancia crítica en el control de la enfermedad en ratones (36). La interacción de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) con los receptores apropiados permiten iniciar la cascada para la respuesta inmune innata y contribuyen con la respuesta inmune adquirida (37). La activación del inflamosoma está implicada en diferentes enfermedades renal crónicas, específicamente el inflamosoma NLRP3, asociado con enfermedades renales crónicas en ratones. La oligomerización de este complejo puede ser una vía que permita el desarrollo de lesiones tisulares, especialmente en el riñón (38).

Las citosinas y quimiocinas inducidas en forma significativa en humanos y ratones incluyen IL-1- $\beta$ , IL-6, IL-10, CCL2 (MCP-1) y TNF- $\alpha$ . En humanos con leptospirosis se encontró incremento del factor estimulador de colonias granulocítico-monocítico (GM-CSF) y (CCL2) también conocida como proteína quimiotáctica de monocitos 1, los cuales promueven la producción de granulocitos y monocitos que favorecen la producción y reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación (39). De igual manera se ha notado que la elevación de la IL-11 es responsable de la producción de plaquetas a causa de la trombocitopenia e inducción de proteínas de fase aguda (39). Hay evidencia *in vitro* local en el riñón de CKCL1/KC, iNOS y CCL2/MCP-1 que es producida por las células renales usando vía TLR1 y TLR2, pero, esto resulta en el reclutamiento de neutrófilos en el riñón (40). Al parecer los macrófagos y polimorfonucleares necesitan de anticuerpos específicos para poder fagocitar leptospiras. En estudios recientes, las plaquetas, además de estar asociadas con hemostasia, muestran ser importantes componentes del sistema inmune innato; estas utilizan TLRs para detectar PAMPs y producir péptidos y citosinas antimicrobianas, su actividad contribuye a la activación de neutrófilos (41,42).

Los anticuerpos juegan un papel importante en la protección contra *Leptospira*. En un ensayo donde se utilizaron ratones tratados con ciclofosfamida, la cual mata linfocitos B preferentemente, los ratones no sobrevivieron a la infección letal. En otro ensayo con ratones con un timo deficiente, incapaces de producir células T, sobrevivieron a la infección (1,3). En ratones con disminución en la función de células B se demostró que la transferencia de anticuerpos contra *Leptospira* (inmunidad pasiva), protege contra la infección letal. En contraste, las células T parecen no ser importantes en la protección contra la infección letal en

ratones (38). El antígeno clave para el desarrollo de la protección inmune de muchas especies hospederas contra *Leptospira* es el lipopolisacárido. Los anticuerpos contra lipopolisacárido son serovariedad específica y proveen una protección cruzada pobre contra otras serovariedades, además la duración de la inmunidad es corta. Los anticuerpos aglutinantes contra el lipopolisacárido generalmente IgM son importantes para el diagnóstico por aglutinación microscópica (AM)(43).

La estimulación de TLR2 y TLR4 con el LPS parece tener un papel principal en la inducción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) durante de la infección. Bajos niveles de IFN- $\gamma$  se correlacionan con una alta carga bacteriana en hígado y riñones de ratones deficientes TLR2 y TLR4, los cuales están involucrados en la eliminación de la bacteria en órganos blanco. Por otro lado, hay resultados que indican que una alta cantidad de TNF- $\alpha$  e IL-10 séricos se correlacionan con un pobre pronóstico en pacientes humanos con leptospirosis severa (44).

Leptospirosis provoca uveítis y pérdida de la visión en caballos por autoinmunidad, debido a que los anticuerpos que reconocen las lipoproteínas de *Leptospira*; LruA y LruB muestran antigenicidad cruzada con proteínas propias de los ojos de caballos (45).

### **MEMBRANA EXTERNA DE *Leptospira***

La membrana externa (ME) es la línea frontal de interacción de la bacteria contra el medio ambiente y el huésped mamífero. A diferencia de la mayoría de espiroquetas, *Leptospira* tiene que ser capaz de sobrevivir en el ambiente y adaptarse al hospedero (46). Además, esta bacteria es rica en lipopolisacáridos (LPS) a diferencia de otras espiroquetas. La composición del LPS consta de 3 componentes: un lípido A, el centro y la cadena de polisacáridos. La

conformación estructural del LPS en *Leptospira* es muy variada, quizá esto explique porque el LPS no es reconocido por TLR4 en humanos, además tiene un sólo residuo fosfato metilado al final del lípido A, que es al parecer una característica muy inusual. Por otra parte, la ME contiene proteínas y lipoproteínas que tienen funciones, las cuales pudieran ser comprendidas según su homología y el estudio previo en otras bacterias (1).

## **PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA**

La superficie de *Leptospira* consiste en un número relativamente corto de proteínas las cuales han sido previamente identificadas. Las principales proteínas expuestas son lipoproteínas (46). Para el estudio de componentes proteicos de membrana externa se han realizado: fraccionamiento de la membrana con Triton X-114 (47) aislamiento en forma de vesículas por plasmólisis alcalina (48) y separada del cilindro protoplásmico por densidad de gradientes de sucrosa, marcaje por biotilación de superficie (30), inmunofluorescencia, MALDIT-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight) (49), y microarreglos de DNA (50).

Las lipoproteínas bacterianas son proteínas que han sido postraduccionalmente modificadas con ácidos grasos. Estas moléculas se han asociado con la periferia de la membrana. Tratamientos con urea y sal remueven de la membrana de las proteínas, pero no las lipoproteínas. La mayoría de los componentes proteicos son hidrofílicos cuando son expresados de manera recombinante (51). En *Leptospira*, el producto es exportado a través de la membrana interna por el complejo traslocasa Sec hacia el espacio periplásmico, en este lugar se retira el

péptido señal y después del plegamiento proteico se adhieren lípidos en los residuos de cisteína, todo esto realizado por un complejo enzimático (52).

### **LipL32**

LipL32 es la lipoproteína más abundante en *Leptospira* presente en serovariedades patógenas, es altamente inmunogénica. Se estima que ocupa el 20% del total de todas las proteínas de la membrana externa, por su alta proporción y mejor conservación en presencia de calcio, se pensó que podía tener una función estructural (51). Sin embargo, LipL32 parece no tener un papel en la integridad de la membrana externa dado que en la mutación en el gen *lip/32* de *L. interrogans* producida por medio de transposones dio como resultado una pobre cantidad de LipL32, pero tuvo una morfología y desarrollo normal en comparación con cepas de campo. La respuesta inmune contra LipL32 es a través de TLR2, se expresa durante la infección, sin embargo, no es esencial para la infección dado la mutante por transposición de *lip/32* fue capaz de infectar a hámsteres y ratones (53). Esta lipoproteína parece estar localizada en el espacio periplásmico en la cara interna de la membrana externa. LipL41 ocupa el tercer lugar en abundancia como proteína de membrana. (53)

### **Loa22 y otras proteínas similares a OmpA**

Loa22 es la segunda proteína de membrana externa más abundante. Hay ciertas dudas según diversos algoritmos bioinformáticos en cuanto a clasificarla como lipoproteína (26). Loa22 a diferencia de LipL32 es una proteína expuesta sobre la superficie celular comprobado por medio de inmunofluorescencia. Está unida al peptidoglicano por medio de su dominio carboxiterminal. La expresión de esta proteína es esencial para la virulencia en especies patógenas corroborado mediante ensayo con transposones donde leptospiras mutantes produciendo

poca cantidad de Loa22 fueron incapaces de matar hámsteres. Por otro lado *L. biflexa* tiene el gen presente con una homología de 56% (42).

### **Familia lig de lipoproteínas de membrana externa**

Las proteínas LigA, LigB y LigC son lipoproteínas de *Leptospira* similares a inmunoglobulinas. Su estructura está compuesta por un péptido señal, seguido por una serie de 12-13 dominios similares a inmunoglobulinas (Ig) conformando una lipoproteína. La osmolaridad y la temperatura son señales medioambientales clave para la expresión de proteínas Lig. La adición de sales (NaCl, KCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) en medio de cultivo inducen la expresión de LigA y LigB (55). La expresión de estas proteínas por omolalidad y temperatura sugiere expresión temprana durante la infección en mamíferos y denota interacción entre huesped y hospedador (56).

Lig A es encontrada en cepas *L. kirschneri* y *L. interrogans*. Mientras que Lig B es encontrado en todas las especies patógenas. Lig C es un pseudogen o bien está ausente en algunas cepas (57).

Una forma lipidada de LigA recombinante expresada en *E. coli* mostró protección como vacuna oral contra desafío letal en hámsteres con la cepa homóloga de *L. interrogans* Serovariedad Copenhageni, pero no protege contra el desafío con serovariedades diferentes (31).

### **Porinas OmpL1**

La primer porina OmpL1 se descubrió por inmunoprecipitación de las proteínas de superficie donde los anticuerpos contra *L. kirschneri* se agregaron a la

bacteria intacta seguida de un lavado gentil para remover los anticuerpos no unidos y posteriormente las proteínas unidas a los anticuerpos fueron solubilizadas con detergente Triton X-100, después fueron purificadas mediante el uso de proteína A. Del inmunoprecipitado se encontraron 3 proteínas con masas moleculares de 33, 41 y 44 kD (47). La proteína de 33 kD se encontró en mayor cantidad, posteriormente se aisló el gen que codifica para esta proteína, la cual reveló una serie de segmentos transmembranales visualizados por microscopia por fractura-por congelamiento de electrones, a esta proteína se le llamó OmpL1, la cual tiene varias propiedades típicas de las porinas; es modificable por el calor en la electroforesis, es un trímero unido cruzado y tiene la habilidad de formar canales en la bicapa lipídica (58).

## **SISTEMAS DE SECRECIÓN BACTERIANA**

Las bacterias Gram negativas poseen diferentes sistemas de transporte de proteínas, las cuales son sintetizadas en el citoplasma y tiene que ser exportados a distintos destinos en la célula y medioambiente extracelular. Del 20 al 30% del total de las proteínas se localizan fuera del citosol. La membrana interna contiene 3 principales sistemas de translocación e inserción de proteínas, estos son: por medio de translocón Sec presente en todas las bacterias, arqueas y membrana del retículo endoplásmico de las células eucariotas, la insertasa YidC y el sistema Tat (de doble arginina) (59,60). El translocón Sec, consiste en el heterotrimero SecYEG que forma un canal en la membrana y que tiene una función dual que es la de permite la translocación de proteínas no plegadas a través del poro y la integración de proteínas alfa-hélices en la membrana interna. La insertasa YidC incluye proteínas que cooperan con el translocón SecYEG mediante la integración de proteínas de membrana, pero también funcionan como una

insertasa independiente, dependiendo del tipo de proteínas que necesiten ser transportadas, la partícula de reconocimiento de señal (SRP), el receptor, Sec A y chaperonas son requeridas para coordinar el traslado para el transporte y la energía de los diferentes sistemas de transporte (48).

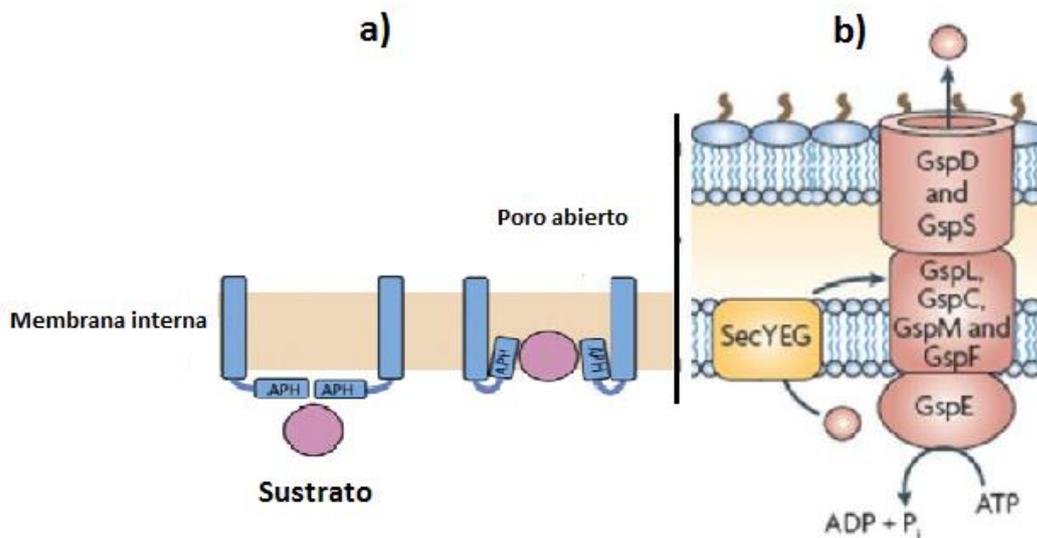


Figura 2. a) Modelo del sistema TAT (de doble arginina). En ella se reconoce el sustrato, se abre el complejo anfipático (APH) y permite la traslocación de la proteína. b) Complejo proteico SecYEG en el sistema de secreción tipo II. Imagen modificada de Patel R. *et al.* 2014; Fronzes R. *et al.* 2009).

El translocón Sec tiene 2 funciones: transporte de proteínas en la membrana externa colaborando algunas veces con la insertasa YidC. La insertasa YidC es probablemente el sistema más simple de integrar proteínas de membrana a la membrana citoplásmica, puede actuar sola o con ayuda del translocón Sec. (61).

El sistema Sec está compuesta por 7 subunidades en las bacterias las subunidades SecB acarrean proteínas secretadas hacia la subunidad SecA el cual con SecYEG y SecDF forma un complejo para la translocación y secreción de proteínas (62).

El sistema Sec coopera con patrones de proteínas como SecA o partículas de reconocimiento de señales (SRP) las cuales reconocen una secuencia señal/señal ancla (SA) que contienen sustratos que inician la localización en la membrana. Por su parte, SRP también se une a la insertasa YidC. El sistema Tat aparece como una secuencia de reconocimiento de proteínas en el citosol. Para algunas proteínas Tat dependientes, la secuencia Tat específica se une a chaperonas como TorD o DmsD y frecuentemente se codifican en los mismos operones con los sustratos de Tat (61).

Las mutaciones en *SecA*, *SecD*, *SecF* y *SecY*, confirieron defectos en la secreción de proteínas y fueron referidos como alelos *sec*, mientras que (*prlD=secA*; *prlG=secE*; *prlA=SecY*, *prlH=SecG*) fueron identificados como supresores que siguieron la secuencia señal de pre-proteínas defectuosas (61).

En *E. coli* la secreción de proteínas comprende varios pasos; Primero la preproteína es marcada en la membrana interna y mantiene sus componentes en estado de translocación por chaperonas citosólicas. Después la translocación a través de la membrana ocurre con la preproteína en un estado no plegado; estas son procesadas para madurar a proteínas y ser plegadas con una conformación activa y en algunos casos ensamblada en alto orden estructural a este proceso se refiere como secreción de proteínas. Las preproteínas tienen 2 dominios: una secuencia líder o secuencia señal (de 15 a 30 aminoácidos de largo) amino terminal y la secuencia de la proteína final(59).

Una búsqueda BLAST para los componentes del genoma y proteoma de los sistemas de secreción de *Leptospira* reveló la presencia de sistemas de secreción tipo I y tipo II en *L. interrogans* serovariedad lai Cepa 56601. Además, esta cepa también exhibe un sistema de translocasa Sec y sistema de

translocasa Tat. Los genes TolC pueden funcionar con varios tipos de transportadores o solos para crear canales periplásmicos y la relación entre canales TolC y sistemas de secreción tipo I está bien definido. Se ha reportado que el sistema de secreción tipo I puede exportar hemolisinas al medio ambiente extracelular. Hay al menos 11 hemolisinas en el genoma de *L. interrogans*. Es posible que este sistema de secreción sea activo durante la hemorragia pulmonar ya que funciona como exportador de hemolisinas durante este proceso. El sistema de secreción tipo II o sistema general de secreción es la principal vía para la translocación de proteínas no plegadas a través de la membrana y esta generalmente conservado en bacterias Gram-negativas que secretan enzimas y toxinas a través de la membrana externa. Las proteínas secretadas que siguen esta vía contienen un péptido señal aminoterminal. El correcto ensamblaje del sistema de secreción tipo II requiere un conjunto de proteínas Gsp. 9 proteínas Gsp (GspD, GspC, GspF, GspG, GspJ, GspK, GspL, GspM y GspE) se han identificado en el genoma de *L. interrogans*, sugiriendo que esta cepa *L. interrogans* Serovariedad lai tiene un sistema de secreción tipo II relativamente completo. Casi 66 proteínas identificadas en este estudio, 14 parecen tener un péptido señal (vía Sec) y por lo tanto podrían ser exportados a través del sistema de secreción tipo II. El sistema Tat en *Leptospira*, o translocación por doble arginina requieren una secuencia específica amino terminal, R-R-XF-L-K las cuales son rotas después de la exportación. Un análisis *in silico* reveló la presencia de TatA, TatB y TatC en el genoma y proteoma de *L. interrogans* (63).

## SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO II

El sistema de secreción tipo II es empleado por una gran cantidad de bacterias Gram negativas para secretar diferentes proteínas extracelulares a través de la membrana externa. Al conjunto de proteínas que conforma el sistema se le llama secretón. Es importante mencionar que no todos los componentes mostrados en la siguiente figura están presentes en todos los T2SS. El sistema de secreción tipo II está compuesto de 12 a 15 diferentes proteínas que forman 3 diferentes subconjuntos: 1) La plataforma de la membrana interna consiste de cada copia múltiple de GspC, GspF, GspL y GspM con una asociación citoplásmica con la ATPasa ; 2) Los pseudopilis, un filamento acomodado de pseudopilinas y 3) Un gran poro hecho fuera del complejo de membrana que consiste principalmente de la secretina GspD (64).

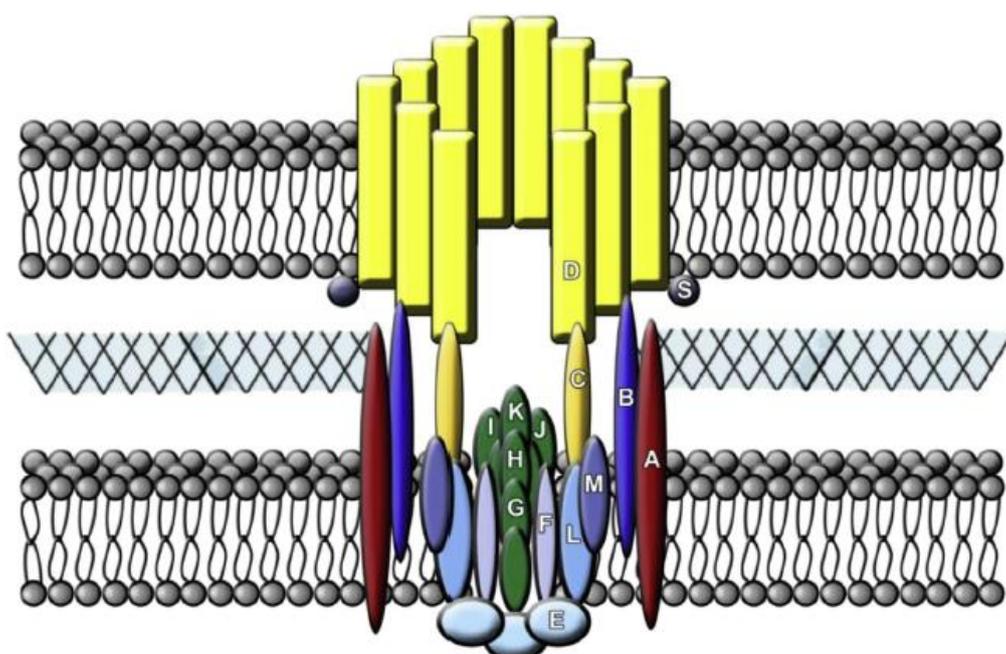


Figura 3. Tomada de Peter Howard 2013. Donde se esquematiza el secretón T2SS. No todos los componentes están siempre presentes. No está la explicación de esta imagen.

## LA SECRETINA GspD

El sistema tipo 2 T2S permite a las bacterias secretar un gran número de proteínas al medio extracelular a través de un poro compuesto (Figura 2) por subunidades de 50 a 70 kDa y está entre las proteínas de membrana más grandes conocidos (65). GspD forma un complejo dodecamérico, vista en un estudio por microscopía electrónica. Los residuos 300 a 400 de GspD en el carbono terminal contienen los segmentos más conservados de la superfamilia de la secretina el cual forma un poro en la membrana. Se ha demostrado en *Vibrio cholerae* que GspC y GspD interactúan y además parece ser crítica para la función y posiblemente para cada ensamble del T2S (66). GspD es una proteína conservada, esta secretina forma una superfamilia involucrada en el sistema de transporte de grandes sustratos macromoleculares a través de la membrana externa. Hay evidencia que los dominios de las primeras regiones N terminal comprendidos por los primeros 320 aminoácidos interactúan con el dominio HR de GspC, formando un vestíbulo periplásmico (67). Alcaraz Sosa (2008) demostró por inmunohistoquímica que GspD se expresa durante la infección experimental. Rodríguez Reyes (200), detectó anticuerpos IgG contra GspD en suero de animales infectados o sospechosos. Núñez Carrera (2009) realizó ensayo de inmunoprotección con rGspD de *L. borgpetersenii* (Hardjovobis) en Hámsteres desafiados con un aislado virulento de *L. interrogans* (Canicola LOCaS46) obtuvo un 80% de sobrevivencia en animales inmunizados con la proteína rGspD), sin embargo, el grupo testigo mostró una sobrevivencia del 60%. Ordoñez López (2010) mostró que los genes componen el locus *gsp* se encuentran altamente conservadas en más del 90% entre las serovariedades patógenas; Canicola, Copenhageni, Lai, Hardhovobis. Mientras

que disminuye considerablemente con serovariedades no patógenas como Patoc (68).

## **VACUNAS ORALES**

La mayoría de los patógenos acceden a través de las membranas mucosas. Por esto las vacunas deben proteger estos sitios para que sean efectivas. Las vacunas de mucosas son ideales y prácticas para vacunaciones masivas, no involucran riesgo de infección por diseminación sanguínea como puede ocurrir con inyecciones con agujas contaminadas, ideal en la prevención de pandemias por enfermedades infecciosas como las provocadas por virus de la influenza. La vacunación por medio de mucosas puede activar la respuesta inmune humoral y celular, a nivel local y sistémico. La inmunización dirigida a mucosas induce una larga memoria celular B y T. La respuesta inmune es iniciada por tejido linfático asociado a mucosas (TLAM) tales como placas de Peyer en el intestino en vacunación oral o tonsilas y adenoides en cavidad nasal en respuesta a inmunización nasal o sublingual. Después de la vacunación vía oral, las barreras mucosas

a la infección se refuerzan, principalmente a través de la inducción de anticuerpo IgA (IgG) secretor específico, que evita que los patógenos y las toxinas

se adhieran o infecten las células epiteliales y rompan la barrera mucosal. La vacunación que va dirigida a inducir inmunidad local en mucosas puede alterar las condiciones de crecimiento de patógenos reduciendo la susceptibilidad a la infección como ejemplo pueden producir péptidos antimicrobianos, quimiocina y citosinas. Es conocido que la respuesta por

interleucina 17 (IL-17) es crucial para el mantenimiento de la barrera mucosa, del reclutamiento de neutrófilos y la liberación de péptidos antimicrobianos como las defensinas. La vacunación dirigida a mucosas inició con la vía oral, seguida de la vía intranasal. Hoy en día se están explorando diferentes vías de vacunación que estimulen la respuesta inmune en mucosas incluyendo, inhalación por aerosoles, intravaginal, rectal y sublingual, todas en modelos animales.

Las vacunas mucosas incluyen ambas reacciones: sistémica y locales. Un enfoque alternativo para prevenir la leptospirosis es la inmunización oral. La inmunización vía oral ha probado proteger en contra de bacterias patógenas como *Vibrio cholerae*, *Salmonella entérica* serovar Typhi y *Borrelia Burgdorferi*. La tolerancia de mucosas previene una respuesta inflamatoria perjudicial, por ejemplo, contra antígenos de comida y tiene un papel en establecer la homeostasis con la microbiota normal y las mucosas. Un problema particular con la exposición de antígenos a mucosas es el riesgo de inducir tolerancia a mucosas antes que inmunidad protectora (69).

### **ANTECEDENTE DE VACUNACIÓN ORAL LigA**

Las proteínas de membrana externa de leptospira son expresadas durante la infección de mamíferos y la interacción con el tejido hospedero, que es un sitio potencial de respuesta inmune. Diversos grupos de investigación han reportado que la inmunización con los dominios 7 a 13 de LigA confiere protección. Además, LigA es expresada durante la infección en condiciones de osmolaridad y temperatura fisiológica. Lourdault et al. en el 2013, inmunizaron con una forma

lipidada de los dominios 7-13 de LigA recombinante expresada en *E. coli* BL21 pLysS vivas por medio de una sonda gástrica a hámsteres sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) con dosis de 37 mg y 148 mg de LigA dosis total respetivamente o su equivalente en *E. coli*. La inmunización resultó en la sobrevivencia de los hámsteres a infección letal, sin embargo, no hubo colonización renal (1,31).

## **JUSTIFICACIÓN**

Leptospirosis es una enfermedad clasificada como reemergente, afecta a prácticamente a todos los mamíferos, es la zoonosis con mayor distribución mundial. Cerca de 500 000 nuevos casos leptospirosis severa se presentan en el mundo en humanos, es potencialmente fatal. Es transmitida principalmente por hospederos reservorios (2).

Actualmente la prevención es mediante bacterinas, las cuales son serovariedad específicas y el periodo de protección es corto (26).

GspD es una proteína de membrana externa, parte del sistema de secreción tipo 2, es abundante, inmunogénica y altamente homóloga entre entre serovariedades patógenas de *Leptospira* (66).

## **HIPÓTESIS**

La proteína recombinante GspD de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 expresada en *E. coli* administrada vía oral protege contra la infección con la cepa homóloga.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el grado de infección por *Leptospira* en hámsteres inmunizados de manera oral con la proteína recombinante GspD.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Sobreexpresar la proteína recombinante GspD de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 en *E. coli* BL21 para las cuales se deben encontrar las condiciones adecuadas.
- Evaluar el grado de protección en hámsteres al administrar la proteína recombinante GspD vía oral en el desafío con la cepa cepa homóloga virulenta de *L. interrogans*..
- Evaluar el efecto protector de la proteína contra la infección.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Se tomaron 5 colonias de *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  y se cultivaron en 20 mL de medio Luria Bertani (LB) a 37°C con agitación orbital de 200 revoluciones por minuto durante 20 horas. Se transfirió 1/20 parte del cultivo a un matraz con medio LB (5 mL de cultivo de día anterior en 95 mL de medio LB) en un matraz de 500 mL. Se incubó a 37°C a una agitación orbital de 200 revoluciones por minuto hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.6 a 600 nanómetros. A partir de este momento se trabajó todo en contacto con hielo por lo que se pusieron a enfriar tubos de plástico de la marca Nalgene de 30 mL y microtubos de 1.5 mL previamente esterilizados. Se enfrió el matraz en hielo durante 10 minutos, posteriormente se centrifugó en tubos Nalgene a 4500 X g a 4°C durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secando el tubo invertido sobre un papel absorbente durante 1 minuto. El pellet se resuspendió en 30 mL de Cloruro de Calcio (CaCl<sub>2</sub>) 50 mM frío, esta suspensión se mantuvo

en hielo durante 3 horas, inmediatamente después se centrifugó a 4500 X g a 4°C durante 10 minutos, se decantó y se colocó el tubo invertido durante 1 minuto, la pastilla se resuspendió en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío y se adicionó 15% de glicerol frío, se homogenizó y se hicieron réplicas de 100 µL en microtubos de 1.5mL, se congelaron a -80°C hasta su uso. Se realizó ensayo de eficiencia de transformación donde se obtuvo una eficiencia de 0.027%.

Se repitió el mismo proceso para preparar células competentes con *E. coli* BL21, obteniendo una eficiencia de transformación de 0.11%.

## **RECUPERACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CEPAS RECOMBINANTES**

Para iniciar la transformación con el plásmido vector, un papel filtro recortado dentro de un microtubo estéril de 1.5 mL se humedeció con 50 µL de agua estéril libre de endonucleasas durante una hora a temperatura ambiente. Este filtro contenía el plásmido pET28a con el gen que codifica para proteína GspD recombinante de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46. Transcurrida la hora se tomó una alícuota con 100 µL de células competentes DH5-α, se pasó de -80°C a un recipiente con hielo durante 10 minutos, junto con el microtubo con el papel filtro humedecido. Se decantó el vial con células competentes en el microtubo y se mantuvo en hielo durante 30 minutos, posteriormente se realizó un choque térmico en baño maría a 42°C por 30 segundos, inmediatamente después se regresó al hielo por 5 minutos. Se agregaron 900 µL de medio LB y se dejó durante 1 hora a 37°C a 200 revoluciones por minuto. Se tomaron 500 µL con trozos de filtro y se sembraron en agar LB con kanamicina 50 µg/mL a 37°C, los otros 500 µL con papel filtro incluido fueron sembrados en 10 mL caldo LB con Kanamicina 50 µg/mL se

incubaron a 37°C a 200 revoluciones por minuto durante toda la noche. Solo desarrolló en caldo, se sembró 10 µL de una dilución 1:10 en placa con agar LB adicionado con antibiótico kanamicina 50 µg/mL. Se aislaron 21 colonias y se realizó PCR de 3 colonias con iniciadores universales,

### **ESCRUTINIO DE COLONIAS RECOMBINANTES MEDIANTE PCR.**

Se eligieron 2 colonias al azar y se hizo PCR utilizando dos iniciadores universales que flanquean al sitio múltiple de clonación de pET28a: un iniciador adelantado del promotor T7 así como el iniciador reverso del terminador T7. Se utilizó para cada reacción 5 µL de amortiguador 10X; 4 µL de MgCl<sub>2</sub>; 2 µL de DNTP's a una concentración de 10 mM cada uno; 2 µL de iniciador adelantado; 2 µL de iniciador reverso a una concentración de 10 mM; 2.5 U de Taq polimerasa; 9.5 µL de agua libre de endonucleasas; se tomó una picadura de colonia teniendo cuidado de tomar únicamente la colonia sin agregar a la mezcla agar del medio de cultivo. Se utilizaron las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C por 5 minutos; 40 ciclos de: 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de alineación a 56°C, 1 minuto 45 segundos a 72°C en la fase de extensión; 1 ciclo final de extensión de 7 minutos a 72°C. Posteriormente se visualizó en gel de agarosa al 1%. El gel se preparó con 33 mL de amortiguador TAE diluido a 1X (TAE amortiguador [Tris-acetate-EDTA][50X]) (Invitrogen, life technologies®).

### **ESCRUTINIO DE BACTERIAS RECOMBINANTES MEDIANTE EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO**

Se utilizó un kit comercial de extracción de plásmido (QIAprep spin mini prep Kit) de la marca Qiagen siguiendo las indicaciones el fabricante.

Un cultivo de 16 horas de *E. coli* BL21 DEA en 10 mL de medio LB con Kanamicina 50 µg/mL, se centrifugó a (6800 X g) por 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se decantó y el pellet bacteriano y se resuspendió en 250 µL de amortiguador PI. Esta suspensión se pasó a un microtubo estéril de 1.5 mL, se agregaron 250 µL amortiguador P2, se mezcló invirtiendo el tubo de 4-6, al hacer esto la suspensión se tornó azul. Este proceso se realizó con el fin de lograr lisis alcalina. Posteriormente se agregó amortiguador N3, se homogenizó invirtiendo el tubo de 4-6 veces hasta que la solución perdió el color azul. Se centrifugó a 6800 X g durante 10 minutos. El sobrenadante fue transferido mediante pipeteo a un tubo con filtro de sílice proporcionado por el fabricante. Se centrifugó nuevamente 6800 X g durante un minuto. Con pH alcalino la membrana de sílice atrapa DNA con alta afinidad. Se decantó para después hacer 2 lavados al filtro; primero con 500 µL de amortiguador PB, luego fue centrifugado y se hizo un segundo lavado con 750 µL de amortiguador PE. Por último, el filtro fue transferido a un microtubo de 1.5 mL y se agregó 50 µL de amortiguador de elución EB, es importante dejar 1 minuto con el amortiguador de elución antes del centrifugado a 6800 X g durante 1 minuto. Finalmente, el plásmido se visualizó en gel de agarosa al 1%.

## **DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN**

Para comprobar la presencia del gen en el plásmido y que éste correspondiera con el peso. Se digirió con las enzimas de restricción Nde1 y Eag1, específicas de los sitios de corte incluidos en el diseño de los iniciadores del gen *gspd*. La digestión se hizo en microtubos estériles de 1.5 mL con la siguiente mezcla:

17 µL de extracto de plásmido

1  $\mu$ L de la enzima Nde1

6  $\mu$ L de amortiguador 3.1 (sugerido por el fabricante para la doble digestión).

1  $\mu$ L de la enzima Eag1

5  $\mu$ L de agua ultra pura libre de nucleasas

### **CONSERVACIÓN DE LAS BACTERIAS RECOMBINANTES**

Las células recombinantes *E. coli* BL21 DE3 con el plásmido pET28a, este conteniendo el gen *gspd* de *L. interrogans* Serovariedad Canicola Cepa LOCaS46 que codifica para la proteína, se sembraron en medio agar Luria Bertani con kanamicina 50  $\mu$ g/mL en estría cerrada e incubadas durante 24 horas a 37°C. Una vez listo el cultivo, se agregaron 5 mL de medio LB+kanamicina 50  $\mu$ g/mL se mezclaron con una barra de vidrio previamente esterilizado mediante flameado, y se transfirieron 700  $\mu$ L de la mezcla en crioviales previamente cargadas con 700  $\mu$ L glicerol estéril. Se resguardaron las alícuotas en -80°C y otras a -20°C hasta ser utilizadas.

### **PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA**

Se sembraron 3 asadas a partir de los crioviales almacenados a -20°C en 10 mL de medio LB con 50  $\mu$ g/mL de kanamicina, se incubó a 37°C con una agitación orbital de 200 revoluciones por minuto durante 16 horas. Se transfirieron 4 mL del cultivo obtenido en 96 mL (1/50) de medio líquido LB con 50 $\mu$ g/mL de kanamicina y se incubaron a 37°C en agitación orbital de 200 revoluciones por minuto hasta llegar a una densidad óptica de 0.600 a 600 nanómetros. En este momento se indujo la expresión de la proteína con isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) durante aproximadamente 2 horas hasta llegar una densidad óptica de 1.500 a 600 nm. Se probaron 3 concentraciones de IPTG: 1.0 mM, 0.5 mM y 0.1 mM.

## **EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA.**

Se utilizaron 2 métodos de extracción de proteína: kit comercial BugBuster® EMD Millipore, el segundo método fue por sonicado. En ambos protocolos se tiene que centrifugar el cultivo de 100 mL en una centrífuga refrigerada a 4°C por 15 minutos a 6000 X g.

Para el protocolo BugBuster se resuspendió la pastilla celular en 997.5 µL 1/20 de BugBuster, por pipeteo, posteriormente se agregaron 3 µL de DNAsa a 0.1 M, se adicionaron 2.5 µL de PMSF para tener una concentración final de 2.5 mM, esta solución se agitó con ayuda del agitador (Vortex), se incubó a temperatura ambiente en una plataforma giratoria durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifugó en microtubo de 1.5 mL estéril a 10000 revoluciones por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 mL estéril.

## **ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS**

Se hizo la electroforesis del sedimento (fase no soluble) y del sobrenadante (fase soluble). En un microtubo de 1.5 mL esterilil, se mezcló la muestra con el amortiguador de carga (apéndice 1) en relación 1:1 para un volumen final de 60 µl, se mezcló por pipeteo, posteriormente el microtubo se selló con papel parafilm para después hervirse durante 5 minutos a 94°C. Se centrifugó a 13 000 Xg durante 5 minutos. Como primer paso se armaron los 2 cristales de 1 mm de espesor comprimidos en un soporte de la marca Biorad®. Se vertió el gel separador (apéndice I) en los cristales, se cubrió con etanol y se dejó polimerizar por 30 minutos aproximadamente, posteriormente se vació el etanol, se secó y

se colocó el gel concentrador (apéndice I), se colocaron los peines en los cuales quedaron formados los pozos, se dejó polimerizar por espacio de 20 minutos. Se retiraron los peines y se agregaron 17  $\mu$ L de la mezcla entre amortiguador de carga y extracto de proteína, uno para cada pozo. Se colocaron los cristales en la cámara de electroforesis y se cubrió con un amortiguador de corrimiento (NuPAGE®MOPS SDS Running amortiguador) de la marca Invitrogen. Se corrió el gel 4% (concentrador) a 50 V durante 15 minutos, posteriormente se incrementó la intensidad de la corriente eléctrica para el gel desnaturizante 12% (gel separador) a 150 V durante 45 minutos aproximadamente (apéndice 1). Una vez terminada la electroforesis, se tiñó el gel con azul de comassie comercial marca Bioirad® sumergido completamente en agitación orbital de 30 revoluciones por minuto a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno con agua destilada en agitación orbital de 30 revoluciones por minuto a temperatura ambiente. Se montaron los geles envueltos en papel celofán transparente hasta secarse para ser almacenados.

## **ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEINAS**

El amortiguador de transferencia (NuPAGE® Transfer amortiguador-20X) se diluyó con agua destilada, se puso a enfriar antes de utilizarlo. Los filtros y membrana PVDF fueron cortados al tamaño de los geles de poliacrilamida. Se humedeció la membrana PDVF en metanol absoluto, posteriormente se humedeció el papel filtro en amortiguador de transferencia.

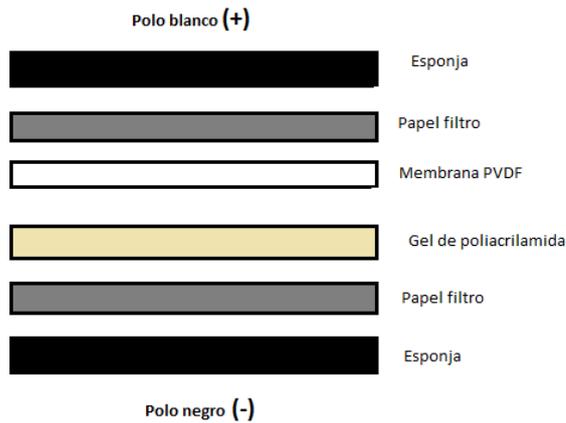


Figura 4. Muestra el acomodo de los componentes para la electrotransferencia de proteínas.

Una vez armado el sándwich se colocó dentro de la cámara de electroforesis y se llenó con el amortiguador de transferencia. Se corrió a 100 V por una hora. Es importante mantener el amortiguador frío por lo que se colocó hielo en las paredes de la cámara.

### INMUNODETECCIÓN TIPO WESTERN

Después de la electrotransferencia se tiñó la membrana PVDF durante 1 minuto con rojo de Ponceau para verificar que se transfirió correctamente. Se lavó la membrana con agua destilada hasta eliminar el resto de colorante. Se dejó bloqueando con leche descremada al 5% en PBS (apéndice 1) durante 1 hora, posteriormente se hicieron 3 lavados con PBS-T por x minutos cada uno. Se dejó incubando la membrana durante 2 horas en PBS-T con 5% de leche descremada con el anticuerpo primario monoclonal (inmunoglobulina G de ratón anti cola de histidinas) diluida 1:2000 en un volumen total de 12 mL. Posterior a esto, se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-T por x minutos cada uno. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario (inmunoglobulina de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante anti IgG de ratón) diluido 1:10,000 en PBS-T con leche 5%. Por último, se hicieron 2 lavados de 10 minutos cada uno, con PBS-T. El revelado se llevó a cabo con ECL-luminol en placa radiográfica.

## **CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA**

Se realizó un ensayo de purificación de proteína por afinidad con columnas de Niquel para su posterior cuantificación. La cuantificación se realizó en un biofotómetro marca AmpliQuant AQ-07 dando como resultado 20.9 mg/mL. Por lo tanto, por cada 100 mL de cultivo se produjeron 20.9 mg de proteína.

## **PREPARACIÓN DE LA VACUNA.**

El cultivo de BL21 DEA conteniendo el plásmido pET28a con el inserto *gspd*, almacenado a -20°C, se sembraron 3 asadas en cada tubo con 10 mL medio LB + kanamicina 50 µg/mL, y se dejaron incubando durante toda la noche en agitación orbital de 200 revoluciones por minuto a 37°C. Al día siguiente, se adicionó 1/25 del cultivo, es decir; 4 mL de cultivo en 96 mL de medio LB + Kanamicina 50 µg/mL en matraces de 500 mL, se incubaron a 37°C con agitación orbital de 200 revoluciones por minuto hasta alcanzar una densidad óptica de 0.600 a 600 nm, en este momento se indujo la expresión de la proteína con isopropil-β-D-1-galactopiranosida (IPTG) a 1 mM, durante 2 horas, alcanzando 1.700 de densidad óptica. Se centrifugó a 20,000 Xg a 4°C, la pastilla celular se resuspendió en 1 mL de PBS con 20% de glicerol. Se congelaron las alícuotas divididas en dosis a -80°C hasta su uso.

## **VACUNACIÓN ORAL**

Se hicieron 4 grupos de 8 hámsteres Sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) de 6 a 8 semanas de edad. Transcurrida la semana de adaptación en el animalario, se inició la vacunación de manera oral tomado como referencia a Lourdault *et al.* 2013 para la dosis y calendario de vacunación.

Todos los animales tenían alimento y agua a libre acceso en todo momento. Se alimentaron durante todo el experimento con alimento comercial de la marca purina (Lab chows). El agua que se les proporcionó fue potable y libre de patógenos. La iluminación durante 10 horas por día fue programada de manera automática para encenderse a las 8:00 horas y apagarse a las 17:00 horas

La semana 1 y 2 se inoculó durante 5 días de martes a sábado, la semana 3 se descansó, la semana 4 se volvieron a vacunar de manera oral durante 5 días de martes a sábado, la semana 5 se descansó y la semana 6 se administró una última vacunación durante 5 días de martes a sábado. Cada dosis de vacuna se mezcló con aproximadamente 100 mg de mermelada de fresa. La preparación de la vacuna comenzó poniendo la mermelada en un aplicador de madera, posteriormente se agregó la dosis de cultivo y con la pipeta se mezcló por 5 segundos hasta hacerse homogénea, se ofreció la vacuna de manera individual. Cada hámster vacunado se cambió de jaula para evitar ser vacunado nuevamente. Las dosis se guardaron a -80°C hasta ser utilizadas.

Grupo 1: Grupo testigo negativo. Se inoculó con su equivalente en cantidad bacteria a 148 mg en cultivo de *E. coli* BL21 DEA conteniendo el vector de expresión pET28a sin el inserto de *gspd*. La cantidad de proteína fue dividida en 20 dosis que correspondieron a 82 µL cultivo en PBS con glicerol 20% por cada día, administrada vía oral a cada hámster.

Grupo 2: Dosis baja. Se vacunó vía oral a cada hámster con 37 mg (dosis total) de proteína dividida en 20 aplicaciones. Cada dosis diaria correspondió a 23 µL de cultivo de *E. coli* con el plásmido pTE28a expresando la proteína GspD de *L. interrogans*. Cada dosis estuvo almacenada a -80°C hasta su uso.

Grupo 3: Dosis alta. Se inoculó vía oral con dosis de 148 mg totales de proteína o su equivalente en *E. coli*. BL21 transformada con pET28a expresando GspD de *L. interrogans*. La dosis diaria fue de 82 µL de cultivo por individuo, divididas en 20 aplicaciones.

Grupo 4: Bacterina. El experimento se llevó a cabo simultáneo con un ensayo de vacunación parenteral con GspD recombinante de *L. interrogans* purificada administrada de manera parenteral, por lo que se tomó como testigo el grupo vacunado con la bacterina (Llanos *et al.* 2016), resultados no publicados.

## RESULTADOS

### PCR DE BL21 RECOMBINANTE

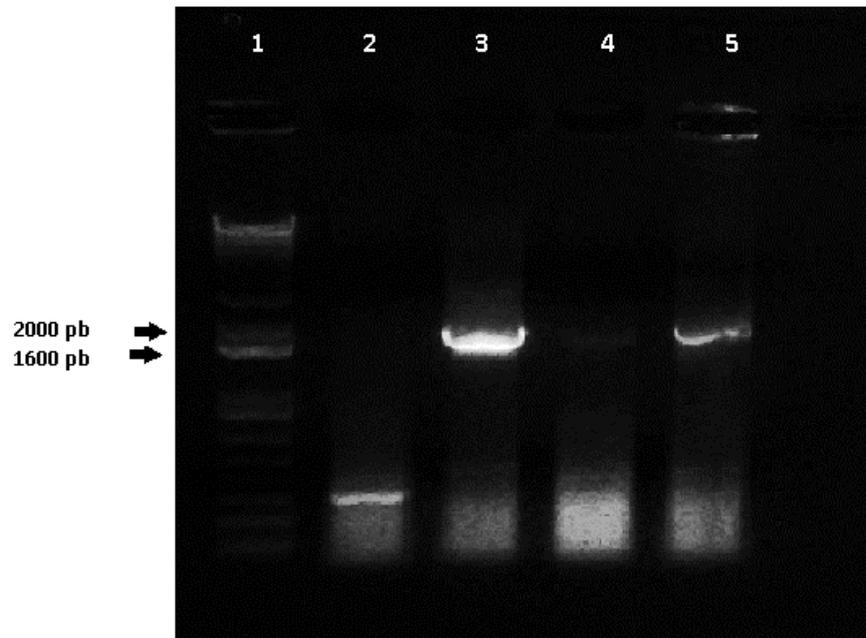


Figura 5. De las tres colonias tomadas al azar se realizó PCR de *gspd* de *L. interrogans* serovariedad Canicola Cepa LOCaS46 inserto en el plásmido pET28a. En el carril 2 se muestra el control negativo; no amplificó el gen de *gspd*. Los carriles del 3 al 5 amplificaron secuencias que corresponde con el gen que codifica para la proteína recombinante. En el carril 3 se observa una *gspd* de *L. interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 en *E. coli* BL21 DEA.

1.- Marcador de longitud de DNA

2.- Colonias de *E. coli* DH5- $\alpha$  con pET28a sin inserto *gspd*

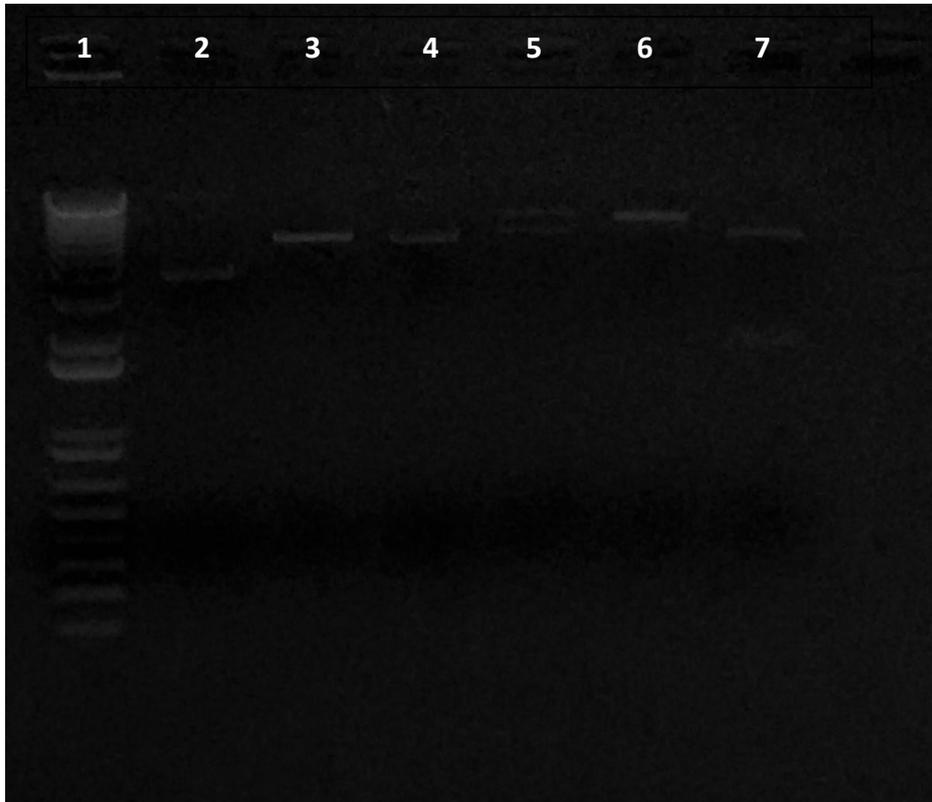
3.- Colonia 1 de *E. coli* BL21 DE3 transformada con pET28a con inserto de *gspd*

4.- ADN de *L. interrogans* serovariedad Canicola Cepa LOCaS46

5.- Colonia 2 de *E. coli* DH5- $\alpha$  transformada con pET28a con inserto de *gspd*

Una vez comprobada la presencia del gen dentro del plásmido se hizo extracción para su posterior digestión y corroborar el tamaño del inserto *gspd* de *L. interrogans*.

## DIGESTIÓN DE PLÁSMIDO



- 1.- Marcado de peso molecular
- 2.- pET28 completo sin inserto
- 3.- pET28a completo sin inserto y digerido con NdeI
- 4.- pET28a + *gspd* completo
- 5.- pET28a + *gspd* digerido con EagI
- 6.- pET28a + *gspd* digerido con NdeI
- 7.- pET28a + *gspd* digerido con las 2 enzimas EagI y NdeI

## INMUNODETECCIÓN TIPO WESTERN DE GspD



1.- 0.1 mmol de IPTG

2.- 0.5 mmol de IPTG

3.- 1.0 mmol de IPTG

Esta figura muestra que en el carril 3 se observa una banda más intensa, por lo que se decide inducir a 1 mM las bacterias que se utilizarán como vacuna.

## PESO DE LOS HÁMSTERES DURANTE LA VACUNACIÓN Y DESAFÍO

El día 0 se pesó a los hámsteres y se desafiaron con *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 virulenta. Los espacios sin datos fueron de individuos muertos o que se les practicó eutanasia. Para el día 10 más de 50% los individuos de cada grupo murieron. Para el día 13, el 75 % de los hámsteres de los grupos vacunados con dosis alta y testigo oral y el 50% de dosis baja había muerto. Para el día 19 sobrevivió 1/8 (12.5%) del grupo testigo, 8/8 (100%) de vacunados con dosis altas murieron y 2/8 (25%) de individuos vacunados con dosis baja sobrevivieron.

		Peso en gramos										
		Día 0	Día 3	Día 5	Día 8	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 16	Día 19	
Testigo oral BL21 pET28a	Hámster 1	109	102	104	106	99	-	-	-	-	-	
	Hámster 2	130	125	126	128	118	116	-	-	-	-	
	Hámster 3	131	122	122	124	116	-	-	-	-	-	
	Hámster 4	114	108	109	110	112	112	112	112	111	112	
	Hámster 5	131	126	116	127	119	-	-	-	-	-	
	Hámster 6	118	115	117	117	109	-	-	-	-	-	
	Hámster 7	137	131	133	134	128	125	-	-	-	-	
	Hámster 8	142	135	137	136	126	126	124	121	-	-	
Vacuna a dosis baja GspD 37 mg	Caja2											
	Hámster 1	147	143	144	144	131	-	-	-	-	-	
	Hámster 2	154	149	150	153	141	-	-	-	-	-	
	Hámster 3	207	202	202	203	187	-	-	-	-	-	
	Hámster 4	158	155	155	155	156	155	151	150	151	146	
	Caja 3											
	Hámster 5	164	163	161	167	148	145	131	132	-	-	
	Hámster 6	104	104	104	104	90	-	-	-	-	-	
Hámster 7	173	171	172	174	152	150	142	124	-	-		
Hámster 8	141	141	143	144	143	142	143	142	145	139		
Vacuna a dosis alta GspD 148 mg	Caja 4											
	Hámster 1	162	163	163	165	146	-	-	-	-	-	
	Hámster 2	180	174	178	176	159	158	158	150	137	-	
	Hámster 3	170	170	169	174	156	-	-	-	-	-	
	Hámster 4	180	177	170	181	162	-	-	-	-	-	
	Caja 5											
	Hámster 5	145	140	140	141	129	128	-	-	-	-	
	Hámster 6	202	190	191	195	182	-	177	-	-	-	
Hámster 7	177	170	169	173	161	-	-	-	-	-		
Hámster 8	160	152	153	155	142	136	-	-	-	-		

El criterio para eutanasia fue: animales que bajaran >10% de su peso corporal, manifestación de dolor, convulsiones, hematuria, epistaxis.

## AGLUTINACIÓN MICROSCÓPICA

Al inicio se realizó una prueba tamiz, para buscar a los individuos que generaron anticuerpos, posteriormente se hicieron diluciones para su titulación. El tamiz y las diluciones se hicieron en volúmenes finales de 70 µL.

El principio de la prueba tamiz es enfrentar una sola vez el suero de los animales infectados contra un cultivo del antígeno infectante para tener como resultado una reacción antígeno-anticuerpo. La mezcla fue hecha con una dilución 1:25 suero/antígeno.

Los sueros reactivos se diluyeron de forma seriada hasta no ver aglutinación. Se reporta a la última aglutinación y se reporta hasta esa dilución.

Número de Hámster	Titulación					
	Testigo Oral día 0	Testigo oral post desafío	Dosis baja 47 mg Día 0	Dosis baja 46 mg post desafío	Dosis alta 148 mg Día 0	Dosis alta 148 mg Post desafío
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	1:800	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	1:800	-	1:800	-	-

La mayoría de los individuos que enfermaron de leptospirosis aguda y no dio tiempo de generar anticuerpos. Por otro lado, los que sobrevivieron hasta el día 19 crearon anticuerpos específicos contra *L. interrogans* serovariedad Canicola.

## DISCUSIÓN

Los programas de inmunización parenteral son difíciles de administrar en áreas con pobre infraestructura médica. Es en éstas zonas donde leptospirosis tiene mayor incidencia. Una alternativa en la prevención de leptospirosis mediante inmunización oral, la cual tiene ventajas como: disminución en el costo, al no ser necesario personal médico capacitado para su aplicación y la más importante es que puede estimular una respuesta local y sistémica, sabiendo que una las vías de infección es mediante penetración en la mucosa (69). Recientemente se han utilizado vacunas orales con buenos resultados en la prevención de algunas bacterias patógenas como *Vibrio cholerae*, *Salmonella entérica* serovar Typhi y *Borrelia burgdorferi* (31).

El avance en biología molecular permite crear proteínas mediante DNA. A dichas proteínas se añaden etiquetas con afinidad específica para la secuencia de interés. Es uso de estas etiquetas permite su detección, cuantificación y purificación.

Las vacunas que existen en la actualidad para la prevención leptospirosis son a base bacterias completas muertas y confieren protección únicamente contra infecciones causadas por cepas homólogas (70). Se han identificado varias proteínas y lipoproteínas inmunogénicas, entre ellas la proteína GspD, que es parte del sistema de secreción tipo II. Rodríguez Reyes en 2009 realizó un ensayo de protección con GspD recombinante de *Leptospira bogpetersenii*

(Hardjobovis) donde se obtuvo 80% de sobrevivencia de los hámsteres desafiados con una cepa virulenta de *Leptospira interrogans* Serovariedad Canicola cepa LOCaS46, sin embargo, tuvo una sobrevivencia de 60% en los controles negativos.

Se tomó como modelo el ensayo de vacunación oral el trabajo de Lourdault *et al.* 2014, donde se inmunizó de manera oral hámsteres Sirio Dorado, con una forma lipidada de la proteína LigA dominio 7-13 de *Leptospira interrogans* Serovariedad Copenhageni cepa Fiocruz L1-130, donde se administró *E. coli* viva expresando LigA mediante una sonda gástrica, donde se obtuvo un 62.5% de sobrevivencia en el grupo vacunado con dosis de 148 mg de la proteína. En este ensayo se modificó la forma de administración de la vacuna, la cual se mezcló el cultivo de *E. coli* recombinante con mermelada. Se hicieron ensayos para comprobar la viabilidad de la bacteria antes de ser administrada resultado una sobrevivencia de más del 80% con respecto a las bacterias que no se mezclaron con mermelada.

En este ensayo no se logró protección contra la infección con la cepa homóloga, donde se tuvo una sobrevivencia en vacunados con dosis baja de 25% y 100% de los vacunados con dosis altas murieron, mientras que 12.5% del grupo testigo negativo murió. Una posible explicación es que la inmunidad celular juegue un papel aún no definido. En ganado la protección contra la serovariedad Hardjo no es dependiente de anticuerpos, pero se correlaciona con la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T. El principal antígeno estimulador de IFN- $\gamma$  es el reconocimiento de LipL32 (70).

Se han utilizado vacunas con cultivos *E. coli* expresando proteínas recombinantes, atribuyendo su éxito a la cualidad que puede actuar como adyuvante natural (71). Por otro lado, se han utilizado adyuvantes en vacunas en mucosas que actúan de diferentes maneras como: el almidón y chitosan que mejoran la adhesión a mucosas (72); moduladores del sistema inmune innato como oligodeoxinucleótidos comerciales (ODN) que actúan sobre TLR9, lípido A monofosforilado en TLR4, el ligando flagelina sobre TLR5 (73); enterotoxinas de *E. coli* con dmLT se sabe que actúan sobre la células dendríticas (74); porciones de toxina de *Vibrio cholerae* que se unen de manera específica a IgG y activan mastocitos potenciando la producción de anticuerpos (75) y nanopartículas biodegradables como (PLG) poli lactido-co-glicolido que contiene liposomas y micropartículas inmunoestimulantes (69). La elección de alguno de estos adyuvantes puede mejorar los resultados en ensayos posteriores en el uso de vacunas orales o dirigidas a estimular inmunidad en mucosas.

En este ensayo se produjo 2.0 mg de proteína GspD *Leptospira interrogans* Serovariedad Canicola cepa LOCaS46 en 100 mL de cultivo en el vector de expresión pET28a en *E. coli* BL21 DEA. Se ha utilizado *E. coli* BL21 en trabajos anteriores para para la producción de proteínas recombinantes de Leptospiras patógenas como es el caso se LipL32 y LigA (31,70) Distintos vectores de expresión se han utilizado para obtener proteínas recombinantes. Recientemente Rodríguez reyes en 2009 utilizó pET28a para producir la proteína recombinante GspD de *Leptospira borgpetersenii*.

La vía de inoculación más utilizada en el desafío con cepas patógenas en modelo hámster es intraperitoneal (52). Sin embargo, en este trabajo se utilizó la vía

intra-avazonal que se acerca de manera más real a la forma natural a la infección natural.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Adler B. *Leptospira and Leptospirosis* - Springer [Internet]. Monash University, Clayton VIC Australi; 2015 [cited 2016 Sep 12]. 293 p. (1; vol. 1). Available from: <http://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-662-45059-8>
2. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Apr;14(2):296–326.
3. Faine S. *Leptospira and leptospirosis*. Melbourne, Australia: MediSci; 1999.
4. Noguchi H, Kligler IJ. IMMUNOLOGICAL STUDIES WITH A STRAIN OF LEPTOSPIRA ISOLATED FROM A CASE OF YELLOW FEVER IN MERIDA, YUCATAN. *J Exp Med.* 1920 Oct 31;32(5):627–37.
5. Sánchez-Montes S, Espinosa-Martínez DV, Ríos-Muñoz CA, Berzunza-Cruz M, Becker I. Leptospirosis in Mexico: Epidemiology and Potential Distribution of Human Cases. Wooten RM, editor. *PLOS ONE.* 2015 Jul 24;10(7):e0133720.
6. Faine S. *Leptospira and leptospirosis*. Melbourne, Australia: MediSci; 1999.

7. Farrelly HE, Adler B, Faine S. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J Med Microbiol.* 1987 Feb;23(1):1–7.
8. Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 2010 Sep;5(9):1413–25.
9. Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New *Leptospira* Species. *Int J Syst Bacteriol.* 1987 Oct 1;37(4):407–15.
10. Quinn PJ, editor. *Veterinary microbiology and microbial disease.* 2. ed. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell; 2011. 912 p.
11. Motaleb MA, Corum L, Bono JL, Elias AF, Rosa P, Samuels DS, et al. *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Sep 26;97(20):10899–904.
12. Li C, Wolgemuth CW, Marko M, Morgan DG, Charon NW. Genetic analysis of spirochete flagellin proteins and their involvement in motility, filament assembly, and flagellar morphology. *J Bacteriol.* 2008 Aug;190(16):5607–15.
13. Picardeau M, Brenot A, Saint Girons I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* *flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Mol Microbiol.* 2001 Apr;40(1):189–99.

14. Takabe K, Nakamura S, Ashihara M, Kudo S. Effect of osmolarity and viscosity on the motility of pathogenic and saprophytic *Leptospira*. *Microbiol Immunol*. 2013 Mar;57(3):236–9.
15. Nascimento ALTO, Ko AI, Martins E a. L, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol*. 2004 Apr;186(7):2164–72.
16. Corin RE, Boggs E, Cox CD. Enzymatic degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by *Leptospira*. *Infect Immun*. 1978 Dec;22(3):672–5.
17. Zhong Y, Chang X, Cao X-J, Zhang Y, Zheng H, Zhu Y, et al. Comparative proteogenomic analysis of the *Leptospira interrogans* virulence-attenuated strain IPAV against the pathogenic strain 56601. *Cell Res*. 2011 Aug;21(8):1210–29.
18. Ricaldi JN, Fouts DE, Selengut JD, Harkins DM, Patra KP, Moreno A, et al. Whole Genome Analysis of *Leptospira licerasiae* Provides Insight into Leptospiral Evolution and Pathogenicity. Picardeau M, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Oct 25;6(10):e1853.
19. Coutinho ML, Matsunaga J, Wang L-C, de la Peña Moctezuma A, Lewis MS, Babbitt JT, et al. Kinetics of *Leptospira interrogans* Infection in Hamsters after Intradermal and Subcutaneous Challenge. Coburn J, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Nov 20;8(11):e3307.
20. Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*. 2010 Jan;140(3–4):287–96.

21. Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion From the Complement System: Leptospiral Immunity. *Scand J Immunol.* 2011 May;73(5):408–19.
22. Panaphut T, Domrongkitchaiporn S, Vibhagool A, Thinkamrop B, Sussaengrat W. Ceftriaxone Compared with Sodium Penicillin G for Treatment of Severe Leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 2003 Jun 15;36(12):1507–13.
23. Ressler RA, Griffith ME, Beckius ML, Pimentel G, Miller RS, Mende K, et al. Antimicrobial susceptibilities of geographically diverse clinical human isolates of *Leptospira*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Aug;52(8):2750–4.
24. McClain JB, Ballou WR, Harrison SM, Steinweg DL. Doxycycline therapy for leptospirosis. *Ann Intern Med.* 1984 May;100(5):696–8.
25. Breiner DD, Fahey M, Salvador R, Novakova J, Coburn J. *Leptospira interrogans* Binds to Human Cell Surface Receptors Including Proteoglycans. *Infect Immun.* 2009 Dec 1;77(12):5528–36.
26. Koizumi N, Watanabe H. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. *J Postgrad Med.* 2005 Sep;51(3):210–4.
27. Rathinam SR. Ocular leptospirosis. *Curr Opin Ophthalmol.* 2002 Dec;13(6):381–6.

28. Jost BH, Adler B, Faine S. Experimental immunisation of hamsters with lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans*. *J Med Microbiol*. 1989 Jun 1;29(2):115–20.
29. Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matsunaga J, et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun*. 1999 Dec;67(12):6572–82.
30. Pinne M, Haake DA. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: Presentation of New Data and Reevaluation of Previous Studies. Hartskeerl RA, editor. *PLoS ONE*. 2013 Jan 8;8(1):e51025.
31. Lourdault K, Wang L-C, Vieira A, Matsunaga J, Melo R, Lewis MS, et al. Oral Immunization with *Escherichia coli* Expressing a Lipidated Form of LigA Protects Hamsters against Challenge with *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. *Infect Immun*. 2014 Feb 1;82(2):893–902.
32. Coutinho ML, Matsunaga J, Wang L-C, de la Peña Moctezuma A, Lewis MS, Babbitt JT, et al. Kinetics of *Leptospira interrogans* infection in hamsters after intradermal and subcutaneous challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Nov;8(11):e3307.
33. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):782–7.
34. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*. 2001 Apr;2(4):346–52.

35. Nahori M-A, Fournie-Amazouz E, Que-Gewirth NS, Balloy V, Chignard M, Raetz CRH, et al. Differential TLR Recognition of Leptospiral Lipid A and Lipopolysaccharide in Murine and Human Cells. *J Immunol*. 2005 Nov 1;175(9):6022–31.
36. Pereira MM, Andrade J, Marchevsky RS, Ribeiro dos Santos R. Morphological characterization of lung and kidney lesions in C3H/HeJ mice infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae: Defect of CD4+ and CD8+ T-cells are prognosticators of the disease progression. *Exp Toxicol Pathol*. 1998 Jan;50(3):191–8.
37. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. *Science*. 2010 Jan 15;327(5963):291–5.
38. Chassin C, Picardeau M, Goujon J-M, Bourhy P, Quellard N, Darce S, et al. TLR4- and TLR2-Mediated B Cell Responses Control the Clearance of the Bacterial Pathogen, *Leptospira interrogans*. *J Immunol*. 2009 Aug 15;183(4):2669–77.
39. Wang H, Wu Y, Ojcius DM, Yang XF, Zhang C, Ding S, et al. Leptospiral Hemolysins Induce Proinflammatory Cytokines through Toll-Like Receptor 2- and 4-Mediated JNK and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. Giambartolomei GH, editor. *PLoS ONE*. 2012 Aug 1;7(8):e42266.
40. Yang C-W, Hung C-C, Wu M-S, Tian Y-C, Chang C-T, Pan M-J, et al. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. *Kidney Int*. 2006 Mar;69(5):815–22.

41. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Delezay O, Pozzetto B, McNicol A, et al. Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *Br J Haematol.* 2008 Apr;141(1):84–91.
42. Yeaman MR. Platelets in defense against bacterial pathogens. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Feb;67(4):525–44.
43. Adler B, Faine S. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* Serovar pomona. *Infect Immun.* 1976 Sep;14(3):703–8.
44. Kyriakidis I, Samara P, Papa A. Serum TNF- $\alpha$ , sTNFR1, IL-6, IL-8 and IL-10 levels in Weil's syndrome. *Cytokine.* 2011 May;54(2):117–20.
45. Verma A, Artiushin S, Matsunaga J, Haake DA, Timoney JF. LruA and LruB, novel lipoproteins of pathogenic *Leptospira interrogans* associated with equine recurrent uveitis. *Infect Immun.* 2005 Nov;73(11):7259–66.
46. Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, et al. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun.* 2005 Aug 1;73(8):4853–63.
47. Haake DA, Walker EM, Blanco DR, Bolin CA, Miller MN, Lovett MA. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during in vitro cultivation. *Infect Immun.* 1991 Mar;59(3):1131–40.
48. Haake DA, Matsunaga J. Characterization of the *Leptospiral* Outer Membrane and Description of Three Novel *Leptospiral* Membrane Proteins. *Infect Immun.* 2002 Sep 1;70(9):4936–45.

49. Malmström J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, Aebersold R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature*. 2009 Aug 6;460(7256):762–5.
50. Lo M, Bulach DM, Powell DR, Haake DA, Matsunaga J, Paustian ML, et al. Effects of Temperature on Gene Expression Patterns in *Leptospira interrogans* Serovar Lai as Assessed by Whole-Genome Microarrays. *Infect Immun*. 2006 Oct 1;74(10):5848–59.
51. Matsunaga J. Novel 45-Kilodalton Leptospiral Protein That Is Processed to a 31-Kilodalton Growth-Phase-Regulated Peripheral Membrane Protein. *Infect Immun*. 2002 Jan 1;70(1):323–34.
52. Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology*. 2000 Jul 1;146(7):1491–504.
53. Murray GL, Srikrum A, Hoke DE, Wunder EA, Henry R, Lo M, et al. Major Surface Protein LipL32 Is Not Required for Either Acute or Chronic Infection with *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*. 2009 Mar 1;77(3):952–8.
54. Ristow P, Bourhy P, McBride FW da C, Figueira CP, Huerre M, Ave P, et al. The OmpA-Like Protein Loa22 Is Essential for Leptospiral Virulence. *PLoS Pathog*. 2007;3(7):e97.
55. Matsunaga J, Sanchez Y, Xu X, Haake DA. Osmolarity, a Key Environmental Signal Controlling Expression of Leptospiral Proteins LigA and LigB and the Extracellular Release of LigA. *Infect Immun*. 2005 Jan 1;73(1):70–8.

56. Croda J, Ramos JGR, Matsunaga J, Queiroz A, Homma A, Riley LW, et al. Leptospira Immunoglobulin-Like Proteins as a Serodiagnostic Marker for Acute Leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2007 May 1;45(5):1528–34.
57. McBride AJA, Cerqueira GM, Suchard MA, Moreira AN, Zuerner RL, Reis MG, et al. Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. *Infect Genet Evol*. 2009 Mar;9(2):196–205.
58. Shang ES, Exner MM, Summers TA, Martinich C, Champion CI, Hancock RE, et al. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infect Immun*. 1995 Aug;63(8):3174–81.
59. Arkowitz RA, Bassilana M. Protein translocation in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Dec 9;1197(3):311–43.
60. Patel R, Smith SM, Robinson C. Protein transport by the bacterial Tat pathway. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2014 Aug;1843(8):1620–8.
61. Kudva R, Denks K, Kuhn P, Vogt A, Müller M, Koch H-G. Protein translocation across the inner membrane of Gram-negative bacteria: the Sec and Tat dependent protein transport pathways. *Res Microbiol*. 2013 Jul;164(6):505–34.
62. Yan S, Wu G. Large-Scale Evolutionary Analyses on SecB Subunits of Bacterial Sec System. Freitag NE, editor. *PLOS ONE*. 2015 Mar 16;10(3):e0120417.

63. Zeng L, Zhang Y, Zhu Y, Yin H, Zhuang X, Zhu W, et al. Extracellular Proteome Analysis of *Leptospira interrogans* serovar Lai. *OMICS J Integr Biol*. 2013 Oct;17(10):527–35.
64. Peter Howard S. Assembly of the type II secretion system. *Res Microbiol*. 2013 Jul;164(6):535–44.
65. Ernesto Armando Rodríguez Reyes. Antigenicidad de la proteína de membrana externa GspDL, la supuesta secretina del T2SS de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis). [Thesis]. [Ciudad de México]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2007.
66. Korotkov KV, Johnson TL, Jobling MG, Pruneda J, Pardon E, Héroux A, et al. Structural and Functional Studies on the Interaction of GspC and GspD in the Type II Secretion System. Kubori T, editor. *PLoS Pathog*. 2011 Sep 8;7(9):e1002228.
67. 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*. 1997 Nov;26(04):789–97.
68. Hidalgo Ruiz M. Estudio sobre la inmunogenicidad de la secretina gspd de *leptospira*. [Ciudad de México]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
69. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jul 25;12(8):592–605.

70. Deveson Lucas DS, Cullen PA, Lo M, Srikram A, Sermswan RW, Adler B. Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. *Vaccine*. 2011 Apr;29(18):3413–8.
71. Erdile LF, Guy B. OspA lipoprotein of *Borrelia burgdorferi* is a mucosal immunogen and adjuvant. *Vaccine*. 1997 Jun;15(9):988–95.
72. van der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Nov 5;52(2):139–44.
73. Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang B-G, Jung Y-J, Nishiyama M, et al. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol*. 2008 Jul;9(7):769–76.
74. Summerton NA, Welch RW, Bondoc L, Yang H-H, Pleune B, Ramachandran N, et al. Toward the development of a stable, freeze-dried formulation of *Helicobacter pylori* killed whole cell vaccine adjuvanted with a novel mutant of *Escherichia coli* heat-labile toxin. *Vaccine*. 2010 Feb;28(5):1404–11.
75. Fang Y, Larsson L, Mattsson J, Lycke N, Xiang Z. Mast Cells Contribute to the Mucosal Adjuvant Effect of CTA1-DD after IgG-Complex Formation. *J Immunol*. 2010 Sep 1;185(5):2935–41.

**Medio Ellinghausen-MacCullough modificado por Johnson y Harris EMJH  
para preparar 500 mL + suero de conejo.**

Es un medio líquido para cultivo de *Leptospira*.

**Solución A)**

Disolver 400 mL de agua destilada esterilizada por autoclave 5 g de albúmina sérica bovina fracción V

Una vez disuelta la albúmina se agrega:

Fosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	0.5 g
Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.15 g
Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )	0.5 g
Piruvato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COCOONa}$ )	0.1 g
Acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )	0.05 g

**Solución B)**

Disolver en 50 mL de agua destilada esterilizada por autoclave:

Tween 80 (ajustar la pipeta a 700 $\mu\text{L}$ )	625 $\mu\text{L}$
Sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.005 g
Cloruro de amonio (2.5g/10 mL)	500 $\mu\text{L}$
Piruvato de sodio (1g/10 mL)	500 $\mu\text{L}$
Glicerina al 10% (1 mL/9 mL)	500 $\mu\text{L}$

Sulfato de zinc	(0.04g/10 mL)	500 µL
Sulfato de manganeso	(0.01g/10 mL)	500 µL
Tiamina HCl	(0.05g/10 mL)	500 µL
Cloruro de calcio	(0.15g/10 mL)	350 µL
Cloruro de magnesio	(0.15g/10 mL)	350 µL
Glicerol 20%	(2mL/8 mL)	250 µL
Vitamina B12	(0.02g/10 mL)	100 µL
Sulfato de cobre	(0.03g/10 mL)	50 µL

Se ajusta el pH de 7.0 a 7.4 cada solución con hidróxido de sodio para alcalinizar y ácido clorhídrico para acidificar.

Mezclar las 2 soluciones y agregar 40-45 mL de suero de conejo previamente filtrado con 0.22 µm. Filtrar toda la mezcla con 0.22 µm, servir en alícuotas de 6 mL e inactivar a 56°C por 40 minutos.

### **Medio Stuart**

Es un medio líquido

Para preparar 500 mL de medio Stuart

En 460 mL se agrega lo siguiente:

Asparagina	0.066 g
Cloruro de amonio (NH <sub>4</sub> Cl)	0.134 g
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O)	0.203 g
Cloruro de sodio (NaCl)	0.904 g

Fosfato disódico ((Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ))	0.33 g
Fosfato monopotásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.0435 g
Rojo de fenol (opcional) al 0.2%	2.5 mL
Glicerina 50%	5 mL

Ya disuelto, se agrega 8 a 10% de suero de conejo previamente filtrado con membrana de 0.22 µm. El pH del medio se debe ajustar entre 7.2 a 7.4. Se filtra toda la mezcla con membrana de 0.22 µm. Por último, se envasa en tubos réplica y se inactiva a 56°C en baño María.

### **Fletcher.**

Es un medio semisólido

Para preparar 500 mL

En 460 mL de agua destilada se agrega lo siguiente:

Extracto de carne	0.1 g
Bacto peptona	0.15 g
Cloruro de sodio	0.25 g
Agar agar	0.9 g

Disuelto se calienta en el mechero hasta alcanzar la ebullición y después de esteriliza por autoclave.

Una vez a temperatura corporal (aproximadamente 37°C) se agrega 40 mL de suero de conejo, previamente filtrado con membrana de 0.22 µm, se homogeniza, se inactiva a 56°C por 40 minutos en baño María y se envasa con 6 mL en tubos de 12 mm por 120 mm.

## **Solución amortiguadora de fosfatos (SAF) O PBS**

Primero se preparan por separado las siguientes soluciones:

1. Solución de Sorensen

- Fosfato disódico anhídrido ( $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) 8.33 g
- Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1.09 g

Se disuelve en 100 mL de agua destilada, se ajusta el pH a 7.6 y se esteriliza por autoclave

2. Solución salina fisiológica

- Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) 8.5g

Se disuelve en 1000 mL de agua destilada, se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza por autoclave.

3. Se mezcla 80 mL de solución Sorensen con 920 mL de solución salina fisiológica, se ajusta el pH a 7.2

## **Amortiguador de muestra**

62.5 mM Tris HCl pH 6.8

10% de glicerol

2% de SDS

## **PBS-T**

PBS

0.05% de Tween 20

## **PMSF Fluoruro de fenil metil sulfonilo**

Para preparar a 25 mM en 10 mL, se disuelve en isopropanol 0.043 g. Se filtra con membranas de 0.45  $\mu\text{m}$ , se diluye 10 veces con amortiguador final de muestra. Quedando a 0.25 mM.

### **Preparación de geles de poliacrilamida**

#### **1.5 M Tris-HCl, pH 8.8**

Tris Base                    54.45 g

Agua destilada                150 mL

Ajustar el pH a 8.8 con HCl, aforar a 300 mL y almacenar a 4°C.

#### **Tris-HCl, pH 6.8**

Tris base                    6.0

Agua destilada                50 mL

Ajustar el pH a 6.8 con HCl

Aforar a 100 mL y almacenar a 4°C.

#### **SDS al 10%**

Disolver 10 g de SDS en 50 mL de agua destilada, agitar suavemente y aforar a 100 mL.

#### **Persulfato de amonio al 10%**

Disolver 25 mg de persulfato de amonio en 250  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. Esta solución se prepara y se utiliza en el momento de utilizarse.

### **Amortiguador de muestra**

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.0 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS al 10%	1.6 mL
2-Mercaptoetanol	0.4 mL
0.5% de azul de bromofenol en agua	0.4 mL
Agua destilada	3.8 mL

Diluir la muestra 1:1 con el amortiguador de muestra. Calentar a 100 °C durante 5 minutos antes de colocar el pozo del gel. Preferentemente almacenar a 4°C en un recipiente ambar.

### **Preparación del gel separador al 12%**

Agua destilada	3.35 mL
30% acrilamida	4 mL
1.5 M Tris-HCl, Ph 8.8	2.5 mL
SDS al 10%	100 mL
Persulfato de amonio al 10%	50 µL
TEMED	5 µL

El volumen total de monómero 10 mL

La mezcla del gel se prepara agregado los componentes antes mencionado, excepto el persulfato de amonio y el TEMED. Se homogenizan perfectamente los componentes y previo al vaciado de la cámara en la cámara de electroforesis, se agregan los catalizadores (persulfato de amonio y TEMED), se homogeniza

esta nueva mezcla rápidamente por agitación y se vierte al interior de los 2 cristales ensamblados en un soporte de la cámara.

### **Preparación del gel concentrador al 4%**

Agua destilada	3.05 mL
30% acrilamida	0.67 mL
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 mL
SDS al 10%	50 $\mu$ L
Persulfato de amonio al 10%	25 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L

El volumen total de monómero es de 5.05 mL

La mezcla para el gel se prepara agregado los componentes antes mencionados, excepto el persulfato de amonio y el TEMED. Se homogenizan perfectamente los componentes y previo al vaciado de la mezcla a la cámara de electroforesis, se agregan los 2 catalizadores (persulfato de amonio y el TEMED), se homogeniza esta nueva mezcla rápidamente por agitación y se vierte al interior de los cristales ensamblados en un soporte de la cámara.

### **Conservación de geles de poliacrilamida**

Mojar papel celofán dulce con agua bidestilada y mojarse las manos para facilitar el manejo. Colocar papel sobre el cristal, sobre el cristal, poner el gel de

poliacrilamida y cubrir con otro pedazo de papel celofán de mayor tamaño que el del cristal, se eliminan las burbujas y los bordes irregulares y se sujetan las orillas con pinzas para mantenerlo estirado durante 24-48 horas hasta que esté completamente seco.

### **Agarosa**

Se disuelve la agarosa a la concentración que se requiera en amortiguador TAE 1X, se calienta en horno de microondas hasta que alcance la ebullición. La mezcla debe quedar transparente, sin restos de agarosa en el fondo del matraz. Se agrega Bromuro de Etidio 10-15  $\mu$ L de esta solución al 10%.

### **Amortiguador de carga para DNA bacteriano**

La concentración queda 6X y debe diluirse a 1X

38% de sucrosa	1.9g
0.1% de Azul de Bromofenol	5 mg
67 mM de EDTA	0.124 g
Agua bidestilada	5 mL