

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

SECUENCIACIÓN DE RECEPTORES QUIMIOTÁCTICOS DE  
*Mesocricetus auratus* Y DETECCIÓN DE SU TRANSCRIPCIÓN  
INDUCIDA POR LA INFECCIÓN CON *Leptospira interrogans*  
serovariedad Canicola.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**RAÚL MENDOZA MORENO**

Asesores:

MVZ PhD Alfredo Sahagún Ruiz

MVZ PhD Alejandro De la Peña Moctezuma

México, D.F.

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

El presente trabajo fue parcialmente financiado por los proyectos PAPIIT-IN79463, PAPIIT-IN221409 y Texas A&M-CONACYT CE 145355

Al alumno se le otorgó una beca del proyecto Texas A&M-CONACYT CE 145355.

## DEDICATORIA

A la culpable de que todo esto se realizara; Socorro Moreno, mi madre.

A la otra Ciencia...

...la Música.

## AGRADECIMIENTOS

A mi padre por su apoyo incondicional.

A Darina por sus continuas lecciones de vida.

A Enrique (Maracas), Ángel y J. Enrique por todo su Rock and roll.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por haberme formado durante todos estos años.

A los Doctores Ramón Gasque Gómez y Miguel Ángel Blanco Ochoa por haberme brindado la oportunidad de trabajar en el Departamento de Medicina y Zootecnia de Rumiantes.

Al Dr. Alfredo Sahagún Ruíz por su guía, apoyo, paciencia y por la oportunidad de realizar esta tesis.

Al Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma por su valiosa colaboración y comentarios.

A los MVZ Verónica Montes de Oca, Luz Olivia Castillo, José Manuel Ramírez y al Dr. Carlos Carmona por todo su apoyo.

A la QFB Elvia Lazo García por todo su apoyo durante mi estancia en el LIM.

A la IAZ, M en C Karina Hernández Guzmán por sus valiosos comentarios, palabras de aliento y agradable compañía.

A todos los alumnos del Laboratorio de brucelosis y tuberculosis recibirme con las puertas abiertas cuando necesité utilizar su equipo.

A la Dra. Rosa Elena Sarmiento y a su alumna Tere por todo su apoyo.

A la Yuliette y a las chicas del Laboratorio de Micoplasma por su valiosa ayuda durante la realización del experimento.

A mis amigos de la Facultad por soportarme y por seguir haciéndolo.

# CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Características generales de <i>Leptospira</i> .....	3
Requerimientos para el cultivo <i>in vitro</i> .....	4
Modelo animal.....	5
Patogenia de la leptospirosis.....	5
Respuesta inmune a <i>Leptospira</i> .....	8
Quimiocinas.....	11
Receptores de quimiocina.....	11
Estructura de los receptores de quimiocina.....	12
Péptidos formilados.....	12
Receptores de péptidos formilados.....	13
Estructura de los FPR.....	13
FPR1.....	13
CCR1.....	14
CCR2.....	14
CCR5.....	15
CXCR2.....	16
CXCR3.....	17
CX3CR1.....	17
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	20
MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
Diseño de iniciadores.....	21
Extracción de ADN genómico.....	21
Metodología para la prueba de la PCR.....	22

Bacterias.....	23
Activación de la virulencia y verificación de la no virulencia de las variantes de la cepa LOCaS46 de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Canicola.....	24
Conteo bacteriano.....	24
Modelo animal.....	25
Recuperación del microorganismo.....	25
Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA.....	25
RT-PCR y análisis de resultados.....	26
RESULTADOS.....	28
Estandarización de la PCR con iniciadores degenerados.....	28
Secuenciación.....	28
Aislamiento e infección experimental.....	30
Resultados de la transcripción de receptores quimiotácticos.....	31
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	42
APÉNDICES.....	59
Figuras.....	59
Cuadros.....	67

## RESUMEN

MENDOZA MORENO RAÚL. Secuenciación de receptores quimiotácticos de *Mesocricetus auratus* y detección de su transcripción inducida por la infección con *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola. (Bajo la dirección de MVZ PhD Alfredo Sahagún Ruiz y MVZ PhD Alejandro De la Peña Moctezuma).

El hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) es el modelo de la leptospirosis aguda; sin embargo, no se conoce la secuencia de algunos genes de su sistema inmune. Los receptores quimiotácticos de leucocitos son relevantes en la defensa ante infecciones. Basándose en las secuencias nucleotídicas de rata y ratón, se diseñaron iniciadores para amplificar cada receptor por PCR con DNA genómico de hámster. Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas parciales de CCR1, CCR5, CXCR2, CX3CR1 y FPR1 del hámster; y fueron utilizadas en el diseño de iniciadores específicos, para evaluar su transcripción por RT-PCR semicuantitativo en pulmón y riñón de hámsteres infectados experimentalmente con la variante virulenta o con la no virulenta de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46, durante cuatro muestreos. Se determinó que CCR5 es constitutivo en pulmón y riñón. En los hámsteres infectados con la variante virulenta a las 144 h incrementó la transcripción de CXCR2, CX3CR1 y FPR1 en el pulmón; mientras que en riñón, incrementó CCR1, CXCR2 y CX3CR1 en comparación con el grupo testigo y los infectados con la variante no virulenta. El aumento en la transcripción de éstos receptores sugiere una asociación con la infiltración leucocitaria y el daño tisular observado. En este estudio se reporta por primera vez la secuencia parcial de estos receptores quimiotácticos del hámster sirio dorado, así como la inducción de su expresión por *Leptospira* en pulmón y riñón.

## ABSTRACT

The Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*) is the model of acute leptospirosis, however, it is not known the sequence of some genes of the immune system. Leukocyte chemotactic receptors are important in the defense against infections. Based on the nucleotide sequences of rat and mouse, primers were designed to amplify each receptor by PCR with genomic DNA from hamster. Partial nucleotide sequences were obtained for CCR1, CCR5, CXCR2, CX3CR1, and FPR1 of hamster, and were used to design specific primers to evaluate its transcription by semiquantitative RT-PCR in lung and kidney of hamsters experimentally infected with virulent variant or non-virulent of *Leptospira interrogans* serovar Canicola strain LOCaS46 during four samplings. It was determined that CCR5 is constitutive in lung and kidney. In hamsters infected with virulent variant at 144 h increased the transcription of CXCR2, CX3CR1 and FPR1 in the lung, whereas in kidney, increased CCR1, CXCR2 and CX3CR1 as compared to control group and to those infected with the avirulent variant. The increase in transcription of these receptors suggests an association between leukocyte infiltration and tissue injury observed. In this study, it is reported for the first time the partial sequence of these chemotactic receptors of Syrian golden hamster and the induction of its expression by *Leptospira* in lung and kidney.

## INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad causada por bacterias patógenas del género *Leptospira*. Estas bacterias se han encontrado en todas las especies de mamíferos, que han sido estudiados en todos los continentes, con la excepción de la Antártida <sup>(1)</sup>.

La enfermedad es considerada una zoonosis de distribución mundial, con mayor incidencia en regiones tropicales y ha sido identificada como una enfermedad reemergente <sup>(2,3)</sup>.

**Características generales de *Leptospira*.** Taxonómicamente, *Leptospira*, está clasificada en el Dominio Bacteria, Reino Eubacteria, Phylum Spirochaetes, clase Spirochaetes, orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae, género *Leptospira*.

Tradicionalmente, *Leptospira* está clasificada con base en diferencias serológicas en su lipopolisacárido (LPS), siendo la serovariedad el taxón básico <sup>(4)</sup>. Esta clasificación divide a las especies patógenas en más de 260 serovariedades, agrupadas en más de 26 serogrupos; mientras que las especies saprófitas constan de poco más de 60 serogrupos <sup>(2,5)</sup>.

Paralelamente, existe una clasificación genética basada en el análisis de la secuencia de l gen de RNA ribosomal 16S, y en estudios de hibridación de ácidos nucleicos; la cual divide a las leptospiras en 14 especies patógenas y en 16 saprófitas <sup>(6)</sup>.

*Leptospira* mide de 0.1-0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro por 10 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud, tiene forma espiral y es altamente móvil debido a la presencia de dos flagelos periplásmicos; la espiroqueta termina en forma de gancho en uno o ambos extremos. La bacteria, posee membrana citoplasmática, un peptidoglicano y una membrana externa similar a las

bacterias gramnegativas <sup>(7, 8)</sup>. El peptidoglicano, responsable de la forma helicoidal de la bacteria, está separado de la envoltura externa por el espacio periplásmico. <sup>(9)</sup>

Para la visualización de *Leptospira* se utiliza la microscopía de campo oscuro, debido a que se trata de un microorganismo demasiado delgado para observarlo con la tinción de Gram <sup>(10)</sup>.

**Requerimientos para el cultivo *in vitro*.** Las leptospiras son microorganismos exigentes en sus requerimientos nutricionales y su fuente principal de energía son los ácidos grasos de cadena de más de 15 carbonos, por lo cual se le adiciona a los medios de cultivo, suero de conejo o la fracción V de la albumina sérica bovina (ASB). Algunos otros requerimientos son: las vitaminas B1 (tiamina), B12 (cianocobalamina), B6 (biotina), cloruro de amonio; y piruvato de sodio (para primocultivos a partir de muestras clínicas). Los medios adicionados con suero de conejo utilizados para el cultivo de *Leptospira* son Stuart, Korthoff, Cox y semisólido Fletcher; prefiriéndose a este último. Sin embargo, el medio líquido de elección es el EMJH (Ellinghausen y McCulloch modificado por Johnson y Harris), al cual se le adiciona la fracción V de la ASB <sup>(11)</sup>.

En las cepas que ya están adaptadas a condiciones de laboratorio, se observa el desarrollo a partir de 1 a 2 semanas, mientras que en el caso de cepas no adaptadas, su desarrollo puede tardar hasta 13 semanas o más <sup>(2)</sup>. El crecimiento óptimo de *Leptospira* en medios de cultivo es a temperaturas de 28 a 30°C en un ambiente aerobio o microaerofílico. El desarrollo de este microorganismo se observa como una ligera turbidez en medio líquido, mientras que en medio semisólido se forman uno o más anillos (anillo de Dinger), 0.5 cm por debajo de la superficie del medio <sup>(8)</sup>.

**Modelo animal.** Con el propósito de entender la patogénesis de *Leptospira*, se han utilizado varios modelos animales, siendo el hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) el modelo de elección, debido a que reproduce las características de la forma severa de la infección en humano (enfermedad de Weil) <sup>(12)</sup>.

A pesar de la marcada susceptibilidad que presenta el hámster para adquirir la leptospirosis; diversos estudios muestran que la dosis letal 50% (DL50%) varía dependiendo de la cepa utilizada, además del número de pases *in vitro* que dicha cepa haya tenido <sup>(13)</sup>.

Se han explorado diferentes vías de inoculación incluyendo la conjuntival, la subcutánea, la intraperitoneal (IP) para reproducir la infección, siendo la IP la vía de elección, ya que permite controlar mejor el volumen del inóculo <sup>(14, 15)</sup>.

**Patogenia de la leptospirosis.** Se considera a una especie de *Leptospira* patógena en base a sus propiedades genotípicas, las cuales pueden ser o no expresadas; mientras que se considera a una especie de *Leptospira* virulenta cuando expresa las características mediante las cuales produce daño al hospedador. Una cepa patógena puede llegar a perder su virulencia a través de pases en medio de cultivo, pero puede recuperar su virulencia a través de pases en cobayos o hámsteres, o bien mantenerla si se preserva congelada en nitrógeno líquido <sup>(8)</sup>.

Aunque los mecanismos de patogenicidad de *Leptospira* no están completamente esclarecidos, se han identificado algunos factores de virulencia, incluyendo hemolisinas, LPS, glicoproteínas, peptidoglicano, proteínas de choque térmico y flagelina <sup>(16)</sup>.

El hábitat natural de las leptospiras patógenas son los túbulos renales proximales de animales que funcionan como reservorio o huésped de mantenimiento, mientras que el de las leptospiras no patógenas es el agua de estanques o lodos. Fuera del hospedero, las leptospiras patógenas pueden sobrevivir en agua o lodos donde la temperatura sea templada (15°C), posea pH neutro o ligeramente alcalino, y esté protegida de la luz solar<sup>(17)</sup>.

Una característica de las leptospiras patógenas es su habilidad para causar infección crónica, mediante la evasión de la respuesta inmune, a través de la disminución de la expresión de proteínas de membrana externa (PME), la captación de proteínas reguladoras del complemento, entre otros<sup>(18)</sup>. Las leptospiras en los tejidos inducen una respuesta inflamatoria escasa con poca participación de los fagocitos<sup>(19)</sup>.

En animales que no mueren de leptospirosis aguda, *Leptospira* persiste en diversos tejidos, considerados inmunológicamente privilegiados como túbulos renales proximales, cerebro, cámara anterior del ojo y tracto genital de bovinos y porcinos. En el riñón el desarrollo continúa exponencialmente alrededor de 21 a 28 días después de la infección<sup>(20)</sup>.

Se ha observado que la mayor incidencia de leptospirosis ocurre en temporada de lluvias, debido a que aumenta el grado de probabilidad de entrar en contacto con aguas contaminadas con el microorganismo<sup>(21)</sup>.

Lo relevante de la epidemiología de la leptospirosis es el estado de portador, en el cual *Leptospira* coloniza los túbulos proximales del riñón y es excretada por la orina infectando de manera directa o indirecta a otros animales. En el caso de humanos la infección se adquiere tanto de manera directa o indirecta por el contacto con orina de roedores o animales domésticos (ganado, cerdos y perros)<sup>(11)</sup>.

Debido al amplio rango de serovariedades involucradas, a la diversidad de hospedadores, ambientes y a las presentaciones clínicas, la epidemiología de la leptospirosis se agrupa en dos amplias categorías: la leptospirosis adaptada al hospedero y la no adaptada al hospedero. En la primera, el animal se comporta como un hospedero de mantenimiento o reservorio; mientras que en la segunda, el hospedero sufre una enfermedad accidental, con signos y síntomas generalmente graves <sup>(2)</sup>.

La infección ocurre cuando el huésped se expone al agua, lodo o material contaminados con orina de un portador y la bacteria penetra a través de abrasiones en la piel o por mucosas <sup>(11)</sup>.

La leptospirosis tiene una presentación sistémica en humanos y en animales domésticos (perros, ganado y cerdos), la cual se caracteriza por fiebre, insuficiencia hepática y renal, manifestaciones pulmonares, además de fallas reproductivas. Los signos clínicos son variables, dependiendo de la serovariedad y de si ésta se encuentra o no adaptada al hospedero, provocando manifestaciones que van desde subclínicas hasta un cuadro clínico severo <sup>(3)</sup>.

Los perros enfermos de leptospirosis, pueden presentar fiebre, ictericia, vómito, diarrea, coagulación intravascular diseminada, uremia debida a la falla renal, hemorragias y muerte. En ganado y cerdos se observan falla reproductiva, abortos, retención placentaria, momificaciones, nacidos débiles y agalactia. En caballos, como manifestación de infección crónica, se observa uveítis recurrente y en algunos casos pueden presentarse abortos <sup>(11)</sup>.

Por otra parte el cuadro clínico en humanos también es variable, y va desde un estado parecido a la influenza o una infección severa (enfermedad de Weil) acompañada de ictericia, falla hepática, renal y pulmonar, y finalmente ocurre la muerte <sup>(22)</sup>.

En hámsteres, las leptospiras patógenas producen una enfermedad aguda, la cual se manifiesta por trastorno respiratorio que ocasiona hemorragias pulmonares y coagulación vascular diseminada. También se pueden observar patologías neurológicas asociadas con meningitis, incoordinación e hiperestesia; si sobreviven suficiente tiempo se puede observar disminución de la densidad de la orina asociada con falla renal y hematuria <sup>(23)</sup>.

En general, las lesiones ocasionadas por la leptospirosis aguda se caracterizan por el desarrollo de vasculitis, daño endotelial e infiltración de linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y neutrófilos en los órganos blanco <sup>(24)</sup>. Macroscópicamente, es común encontrar numerosas hemorragias petequiales, los órganos pueden apreciarse congestionados o ictericos.

En riñón, el mayor hallazgo es una nefritis intersticial, la cual se encuentra acompañada por una intensa infiltración celular compuesta por neutrófilos y macrófagos. En pulmón es común encontrar hemorragia y congestión (desde un 10 hasta un 90%), además de infiltración por neutrófilos y macrófagos en los espacios alveolares. Puede haber la formación de una membrana hialina y observarse a las leptospiras dentro del septo interalveolar unidas a las células endoteliales capilares <sup>(2)</sup>.

**Respuesta inmune a *Leptospira*.** La inmunidad de tipo humoral es la de mayor importancia en la protección contra la leptospirosis en humanos, perros, cerdos, cobayos y hámsteres <sup>(8)</sup>.

En la leptospirosis muchos de los anticuerpos son producidos contra el LPS <sup>(25)</sup>. Sin embargo, la inmunidad conferida por el LPS está limitada a serovariedades homólogas, a diferencia de los inmunógenos producidos a partir de preparaciones de proteína, las

cuales han demostrado protección contra serovariedades homólogas y heterólogas de *Leptospira* <sup>(26)</sup>.

Por otra parte, en varios modelos experimentales, se ha hecho evidente que la fagocitosis de *Leptospira* por neutrófilos y macrófagos sólo es efectiva si el patógeno es opsonizado por una IgG específica <sup>(27, 28)</sup>.

Estos anticuerpos pueden aglutinar las leptospiras <sup>(29)</sup> y activar la vía clásica del sistema del complemento. Opsoninas como C3b generadas después de la activación del complemento, así como directamente los anticuerpos son importantes para promover la fagocitosis utilizando receptores de complemento y de anticuerpos (FcR) <sup>(30)</sup>.

Se ha observado una predisposición genética a la infección aguda en humanos, asociada con diferencias alélicas en el receptor CPH II (Complejo principal de histocompatibilidad clase II) <sup>(31)</sup>.

La expresión del CPH II en células renales, favorece la presentación de antígenos de *Leptospira*, activando células T CD4+ que producen citocinas proinflamatorias, las cuales contribuyen a la respuesta inmune a *Leptospira* <sup>(32)</sup>. La activación de estas células podría tener un papel importante en la inmunoprotección y patogénesis de la enfermedad renal durante la infección con *Leptospira* <sup>(24)</sup>.

Se ha observado que el LPS de *Leptospira* es atípico en relación al de otras bacterias, ya que éste activa células humanas a través de TLR2 en vez de hacerlo vía TLR4 <sup>(33)</sup>.

Estudios en cultivos de células de túbulo proximal de ratón, han mostrado que extractos de PME de *Leptospira* inducen la producción de citocinas como el Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), quimiocinas como CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CXCL2 (MIP-2) y CXCL8 (IL-8) <sup>(34, 35)</sup>.

Por otra parte, se han realizado ensayos en ratones que han sido desafiados con *Leptospira*, en los cuales se ha observado que la severidad y progreso de la enfermedad

en pulmón se asocia a la sobreexpresión de CCL2 (MCP-1) y de CXCL8 en C3H/HeJ (susceptibles); mientras que en BALB/c (resistentes), se observó solo un ligero incremento de CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) correlacionándolo con su resistencia a la infección por *Leptospira* <sup>(36)</sup>. Recientemente, este mismo grupo mostró que la infección por *Leptospira* estimula tempranamente la expresión de CXCL2 (MIP-2) y TNF- $\alpha$  en ratones BALB/c <sup>(37)</sup>.

Por otro lado, en hámsteres infectados con *L. interrogans* serovariedad Pyrogenes, se observó una sobreexpresión de CXCL10 (IP-10), interleucina 10 (IL-10), Factor transformador de crecimiento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y de TNF- $\alpha$ , sugiriendo que estas citocinas tienen un papel en el reclutamiento de células T y en la patología de la leptospirosis en riñón <sup>(38)</sup>.

Matsui *et al.*, (2011), realizaron un experimento en el cual infectaron hámsteres y ratones con *L. interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa Verdun virulenta. Observaron una pronta regulación de las citocinas proinflamatorias: interleucina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 y TNF $\alpha$ , de la ciclo-oxigenasa-2; además de las quimiocinas: CXCL10 (IP-10) y CCL3 (MIP 1- $\alpha$ ) en tejidos de ratón; a diferencia de lo observado en hámster, en el cual la respuesta fue sobreexpresada y tardía. También observaron que la inducción de IL-10 ocurre más rápido en ratón que en hámster <sup>(39)</sup>.

El tránsito leucocitario es controlado por una serie de proteínas que incluyen a las integrinas, moléculas de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas (ICAM), selectinas, así como por un diverso grupo de moléculas quimiotácticas. Las moléculas quimiotácticas son responsables del movimiento de los leucocitos a los diferentes sitios del organismo <sup>(40)</sup>. Actualmente, se encuentran identificadas un gran número de moléculas quimiotácticas, las cuales incluyen quimioatácticos "clásicos", como los péptidos formilados (N-formil-metionina-leucina-fenilalanina (N-fMLP)), de origen

bacteriano y mitocondrial; componentes activados del complemento (C3a y C5a), leucotrieno B4 (LTB4), factor activador plaquetario (PAF); además de las quimiocinas (41,42).

La característica común que poseen todas estas moléculas quimiotácticas es que activan receptores acoplados a proteínas G (GPCR), expresados tanto en leucocitos como en células hematopoyéticas y en otros tipos celulares (43).

**Quimiocinas.** Las quimiocinas son polipéptidos pequeños, formados por 90 a 130 aminoácidos. Controlan en forma selectiva el tránsito y la activación de subpoblaciones leucocitarias. Algunas quimiocinas participan sobre todo en los procesos inflamatorios, otras se expresan de manera constitutiva y desempeñan funciones homeostáticas o del desarrollo (44).

Las quimiocinas inflamatorias suelen inducirse en respuesta al contacto con el LPS u otros componentes de los microorganismos patógenos o por la acción de las citocinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$  (45), en los sitios en que se desarrolla el proceso inflamatorio.

**Receptores de quimiocinas.** Para que las quimiocinas lleven a cabo el control del tránsito celular; necesitan interactuar con receptores específicos que se encuentran en las células blanco. Los receptores de quimiocina constan de siete regiones transmembranales y están acoplados a proteínas G (GPCR). Al igual que sus ligandos, los receptores de quimiocina se dividen en cuatro clases, de acuerdo a la clase de quimiocina a la que se unen, designándose como CXCR, CCR, CX3CR y el XCR (se le agregó la letra "X" porque CR1 está asignado en el sistema del complemento) (46).

Los receptores de quimiocinas, al igual que sus ligandos se pueden clasificar también en homeostáticos: CXCR4, CXCR5, CCR4, CCR7, CCR9 y en inducibles/inflamatorios: CXCR1, CXCR2, CXCR3, CCR1-6, CX3CR1. Los receptores de quimiocinas tienen mayor expresión en células dendríticas, monocitos y linfocitos (incluidos los Th1 y Th2), además de las células de Langerhans <sup>(47)</sup>.

**Estructura de los receptores de quimiocina.** Los receptores de quimiocina poseen una homología en su secuencia de aminoácidos (aa) del 25 al 80%, lo cual sugiere un ancestro común. Algunas características distintivas de este grupo son: tener una longitud entre los 340 y 370 aa, poseer un segmento N-terminal relativamente ácido. En su segunda asa se observa la secuencia DRYLAIVHA, o variaciones de ésta. Tienen una cisteína en cada uno de los cuatro dominios extracelulares. Otra característica importante es que su marco abierto de lectura carece de intrones <sup>(45)</sup>.

**Péptidos formilados.** La síntesis de las proteínas de eucariontes se inicia con el aminoácido metionina, mientras que los procariontes y las mitocondrias la inician con una N-formil-metionina, por lo que producen péptidos formilados, que actúan como ligandos exógenos y endógenos respectivamente, y facilitan la llegada de los fagocitos a los sitios de infección y daño tisular <sup>(48)</sup>.

Se ha observado que los péptidos formilados poseen una gran capacidad quimiotáctica para los neutrófilos, ya que actúan como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP) y son reconocidos principalmente por FPR1 <sup>(49)</sup>.

**Receptores de péptidos formilados.** Los péptidos formilados, tienen como prototipo el péptido formil-metionina leucina fenilalanina (N-fMLP), se unen a receptores acoplados a proteínas G, denominados receptores de péptidos formilados (FPR1 y FPRL1) <sup>(50)</sup>.

La expresión de los FPR inicialmente fue descrita en monocitos y neutrófilos; después fueron observados en células dendríticas inmaduras, células microgliales, plaquetas, médula ósea, así como en tejidos no hematopoyéticos <sup>(51)</sup>.

En fagocitos, la unión de los FPR con su ligando activa diversos procesos biológicos, como la quimiotaxis, producción de anión superóxido y degranulación <sup>(52)</sup>.

El número de genes en la familia FPR varía en las diferentes especies de mamíferos; en el humano se han identificado tres genes, mientras que en ratón existen al menos seis miembros <sup>(53)</sup>.

En humano, los tres genes descritos son FPR, FPRL1 (FPR-like 1) y FPRL2 (FPR-like 2). El primero tiene mayor afinidad por N-fMLP, mientras que el segundo es un receptor de baja afinidad, y por último FPRL2 no se une a péptidos formilados <sup>(54,55)</sup>.

**Estructura de los FPR.** El gen de FPR se extiende 6 kb, su marco abierto de lectura carece de intrones y es interrumpido por un intrón en su región 5'-no traducida (5'-UTR) <sup>(56)</sup>. El motivo DRY, característico de los GPCR, se encuentra conservado en los receptores de quimiocinas, mientras que en la familia de FPR cambia a DRC <sup>(57)</sup>.

**FPR1.** El receptor FPR1 murino es considerado el ortólogo del FPR humano; su secuencia de aminoácidos es 76% idéntica, además de ser un receptor funcional para N-fMLP, aunque con menor afinidad que su contraparte humana <sup>(58)</sup>. Interesantemente, el FPR1 de conejo muestra una afinidad a péptidos formilados comparable con la del FPR humano, a pesar de contar con un 78% de identidad en aminoácidos <sup>(59)</sup>.

Los FPR reconocen principalmente péptidos formilados de origen exógeno, por lo cual tienen un papel importante en el reconocimiento y fagocitosis de bacterias <sup>(60)</sup>.

**CCR1.** Fue el primer receptor de quimiocina CCR identificado. Su marco abierto de lectura está en un exón, que codifica un polipéptido con una longitud de 355 aa.

En diversos experimentos como de la movilización del calcio, inhibición de la adenil ciclasa, aumento en la acidificación extracelular y la quimiotaxis; se ha observado que el CCR1 humano responde a un número amplio de ligandos incluyendo: CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CCL13 (MCP-4), CCL14 (HCC-1), CCL15 (leucotaxina-1; Lkn-1), CCL23 (MPIF-1), además de CCL2 (MCP-1) y CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), pero a estos últimos dos con baja afinidad y sin capacidad de señalización <sup>(61-67)</sup>.

Con el uso de anticuerpos policlonales se ha observado que este receptor es expresado en monocitos, linfocitos pero no en neutrófilos <sup>(68)</sup>. Sin embargo, está claro que CCR1 puede ser expresado en neutrófilos humanos tras la inducción por citocinas específicas. En células dendríticas se ha detectado RNA de CCR1 y este también parece ser expresado en eosinófilos, además de células NK y mastocitos <sup>(69, 70, 71)</sup>. Por otra parte, los neutrófilos (además de monocitos, eosinófilos y linfocitos B y T) de ratón expresan CCR1 constitutivamente <sup>(72)</sup>.

**CCR2.** El marco abierto de lectura de este receptor presenta empalmados dos exones alternativos que codifican dos distintos polipéptidos de 360 aa (CCR2a) y de 374 (CCR2b) de longitud <sup>(73, 74)</sup>. Los dos tienen una secuencia idéntica hasta el aa 313, en la cual se localiza la región citoplasmática C-terminal con propiedades funcionales similares. Son detectables ambos tipos de RNA en monocitos, células dendríticas (DC)

derivadas de la sangre, células NK y linfocitos T, pero no en neutrófilos y eosinófilos. CCR2b aparenta ser la forma predominante y ha sido identificado en monocitos, células T de memoria activadas, células B y basófilos con anticuerpos monoclonales <sup>(75, 76)</sup>. *In vivo*, responde a la inflamación crónica a través de MCP-1<sup>(77)</sup>. En el ratón solo se conoce una forma de CCR2, la cual es la hómologa de CCR2b<sup>(78)</sup>.

CCR2 se une a varios ligandos inflamatorios/inducibles con alta afinidad incluyendo CCL2 (MCP-1; JE en ratón), CCL7 (MCP-3; FIC en ratón), CCL8 (MCP-2), CCL13 (MCP-4), y CCL12 (MCP-5 de ratón). El CCR2 de ratón tiene 80% de identidad en aminoácidos al CCR2 humano, es expresado por macrófagos peritoneales <sup>(45)</sup>.

**CCR5.** El marco abierto de lectura de este receptor se encuentra en un exón que codifica para un polipéptido de 355 aa. Es expresado en células dendríticas derivadas de sangre periférica <sup>(79,80)</sup>, células madre hematopoyéticas CD34+ y linfocitos Th1 activados y de memoria CD26<sup>high</sup> CD45RA<sup>low</sup> CD45R0+. Los monocitos recién aislados expresan niveles bajos que pueden incrementarse *in vitro* <sup>(81-84)</sup>. De igual manera, células T recién aisladas expresan cantidades bajas que aumentan con la estimulación prolongada de IL-2, mitógenos y otros protocolos de activación *ex vivo* <sup>(82)</sup> o por la inflamación de tipo Th1 *in vivo* <sup>(85)</sup>. CCR5 también se expresa en células T CD8+ y células de Langerhans <sup>(86)</sup>. Se ha reportado CCR5 en células neuronales, endoteliales, epiteliales, astrocitos, músculo liso vascular y fibroblastos <sup>(87)</sup>.

Sus ligandos agonistas de alta afinidad y potencia incluyen CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) <sup>(88)</sup>, CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES), y CCL8 (MCP-2). Otros ligandos son CCL7 (MCP-3), CCL13 (MCP-4), CCL2 (MCP-1) y CCL11 (Eotaxina) <sup>(89)</sup>. CCR5 se ha encontrado de manera constitutiva asociado a CD4 <sup>(90)</sup>.

El CCR5 de ratón tiene selectividad similar a los mismos ligandos que su contraparte humana. Tanto los ratones CCR5  $-/-$  y humanos ( $\Delta 32$ ), parecen saludables <sup>(91)</sup>. En ratones estresados se han identificado ligeros defectos, incluyendo dificultad para eliminar *Listeria*, relativa resistencia a la endotoxina, mayor susceptibilidad a la infección por *Cryptococcus* <sup>(92)</sup>, aumento en la respuesta humoral a antígenos dependientes de células T. En humanos CCR5 funciona como correceptor del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) <sup>(45)</sup>.

**CXCR2.** Es el receptor con mayor expresión en neutrófilos y es el prototipo de receptor para quimiocinas inflamatorias inducibles. Al parecer participa principalmente en la inflamación aguda y en la inmunidad innata. Su marco abierto de lectura es de 355 o 360 codones. La expresión de éste receptor ha sido reportada en granulocitos, monocitos eosinófilos activados por citocinas, basófilos, linfocitos T, mastocitos, células dendríticas y células NK <sup>(45, 93)</sup>.

CXCL8 (IL-8), CXCL1 ( $\text{GRO}\alpha$ ), CXCL5 (ENA-78), CXCL7 (NAP-2), son ligandos selectivos del CXCR2 humano. Las quimiocinas CXCL2 ( $\text{MIP-2}\alpha$ ) y CXCL1 (KC) son ligandos para CXCR2 de ratón <sup>(94, 95, 96)</sup>.

Los ratones CXCR2  $-/-$  no movilizan neutrófilos *in vivo* al peritoneo estimulado químicamente y sus neutrófilos no migran *in vitro* en respuesta a quimiocinas CXCL1 y CXCL2, indicando que CXCR2 es el receptor dominante en neutrófilos para esas quimiocinas <sup>(97)</sup>. Se ha observado que este receptor tiene gran importancia en el control de *Yersinia pestis* <sup>(98)</sup>.

**CXCR3.** Es el principal receptor de quimiocina que es altamente inducido por la activación de células T. Su marco abierto de lectura es interrumpido por un intrón en el segmento N-terminal y predice un polipéptido de 368 aa de longitud<sup>(85)</sup>.

Es expresado por células T, B y NK<sup>(45)</sup>. Aunque en experimentos *in vitro* CXCR3 ha sido asociado a células Th1, *in vivo* no distingue Th1 de Th2<sup>(99)</sup>.

Este receptor es selectivo para CXCL9 (Mig), CXCL10 ( $\gamma$ IP-10) y CXCL11 (I-TAC) y es altamente expresado por linfocitos T activados por IL-2<sup>(100)</sup>, por lo tanto este receptor está involucrado en el reclutamiento selectivo de células T. Trabajos previos mostraron que IP-10 y Mig son quimiotácticos exclusivos para linfocitos T<sup>(101,102)</sup>.

Las células T activadas se unen específicamente a CXCL11 (I-TAC) a través de CXCR3<sup>(103,104)</sup>.

**CX3CR1.** Su único y exclusivo ligando es CX3CL1 (Fractalcina), una vez unidos promueve la adhesión de monocitos, células NK y linfocitos T a endotelios, epitelios y células dendríticas<sup>(105-107)</sup>.

En un modelo de glomerulonefritis en rata Wistar-Kyoto, se observó una marcada inducción de CX3CL1 en el endotelio glomerular, mientras que la expresión de CX3CR1 estuvo aumentada en el infiltrado de leucocitos<sup>(108)</sup>.

## JUSTIFICACIÓN

El conocimiento sobre la respuesta inmune contra *Leptospira* se encuentra limitado, en parte debido a la carencia de reactivos específicos para pruebas inmunológicas en el modelo animal de laboratorio, el hámster, así como a la falta del conocimiento de la secuencias de los genes asociados a la respuesta inmune. Existen algunos estudios enfocados al esclarecimiento de la patogénesis de la leptospirosis, los cuales involucran la participación de receptores tipo Toll, algunas citocinas y quimiocinas. Sin embargo, hasta el momento se desconoce la participación de los receptores quimiotácticos en la leptospirosis; lo cual es de gran importancia, tanto para entender la patogénesis de la enfermedad, así como para encontrar posibles aplicaciones en el tratamiento y la profilaxis.

Con base en lo anterior esta investigación fue enfocada a la secuenciación y a la determinación del perfil de transcripción de receptores quimiotácticos inducidos por la infección experimental con la variante virulenta o la no virulenta de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 en hámster sirio dorado.

## **HIPÓTESIS**

La infección de hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) con una cepa virulenta de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola (LOCaS46), induce una mayor transcripción de receptores quimiotácticos en pulmón y riñón, en contraste con su derivada no virulenta.

## **OBJETIVO GENERAL**

El presente estudio tiene la finalidad secuenciar los receptores quimiotácticos CCR1, CCR2, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 y FPR1 de *Mesocricetus auratus*, así como evaluar su transcripción inducida en pulmón y riñón, por la infección con la variante virulenta o la no virulenta de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Diseño de iniciadores.** Se diseñaron iniciadores degenerados (cuadro 1) a partir de las secuencias conservadas en ratón y rata de los genes CCR1 (NM\_009912.4, NM\_020542.2, NM\_001171124.1 [conejo]), CCR2 (NM\_009915.2, NM\_021866.1) CCR5 (NM\_009917.5, NM\_053960.3), CXCR2 (NM\_009909.3, NM\_017183.1), CXCR3 (NM\_009910.2, NM\_053415.1) CX3CR1 (NM\_009987.3, NM\_133534.1), FPR1 (NM\_013521.2, NM\_001106216.1) disponibles en el *GenBank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa *CLUSTAL W*. Adicionalmente, se diseñaron iniciadores específicos para el gen constitutivo  $\beta$ -actina del hámster (AJ312092.1), el cual se incluyó como control positivo de las reacciones de PCR.

El tamaño de cada iniciador osciló entre 20 y 25 pares de bases, con una temperatura de fusión de 70° C ( $T_m$  70), calculada mediante la regla de Wallace<sup>(109)</sup>. Los iniciadores fueron comparados con el programa *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) a las secuencias disponibles en el *GenBank*; para cerciorarse de que sus nucleótidos correspondieran a los genes de interés. Todos los iniciadores fueron sintetizados por el Instituto de Biotecnología (IBT), UNAM.

**Extracción de ADN genómico.** Se utilizó la punta de la cola de un ratón (*Mus musculus*) y 0.3 cm de hueso largo (radio) de un hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*). Dichos animales fueron eutanasiados por sobredosis de pentobarbital sódico (200 mg/kg de peso vivo) vía intraperitoneal. El DNA fue extraído con el paquete comercial QIAamp<sup>®</sup> (QIAGEN<sup>®</sup>), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de cada extracción, se colocaron 3  $\mu$ l de DNA con 5  $\mu$ l de amortiguador de carga en un

gel de agarosa al 1%, y se sometió a electroforesis para comprobar la calidad de la extracción.

**Metodología para la prueba de la PCR.** Una vez extraído el DNA, se llevo a cabo una reacción de PCR para cada uno de los genes de interés (CCR1, CCR2, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, FPR1 y  $\beta$ -actina), en un volumen de 20  $\mu$ l [2  $\mu$ l de buffer PCR 10X con  $Mg^{++}$  (Roche<sup>®</sup>), 0.2  $\mu$ l de mezcla de dNTP's (10 mM de cada uno), 0.6  $\mu$ l de cada iniciador (10 pMol/ $\mu$ l), 0.05  $\mu$ l de Taq polimerasa (0.25 U, Invitrogen<sup>®</sup>), 15.55  $\mu$ l H<sub>2</sub>O grado PCR y 1  $\mu$ l (100 ng) de DNA]. Se incluyó un testigo negativo conteniendo todos los elementos de la reacción excepto DNA.

La reacción de amplificación se desarrolló en el termociclador Mastercycler<sup>®</sup> (Eppendorf<sup>®</sup>). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 4 min, seguida por 35 ciclos de amplificación (desnaturalización 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min) y una extensión final a 72°C durante 7 min. Los productos de la PCR se separaron por electroforesis a 100 voltios en un gel de agarosa al 1%, el cual fue teñido con una solución de bromuro de etidio al 0.1%, posteriormente fueron observados en el transiluminador de luz ultravioleta Benchtop UV<sup>®</sup> (UVP<sup>®</sup>) y se digitalizaron en el fotodocumentador Gel logic 200 Imaging<sup>®</sup> (Kodak<sup>®</sup>). Las reacciones primeramente fueron desarrolladas con DNA de ratón con el fin de estandarizar el programa de amplificación, así como también para comprobar la funcionalidad de los iniciadores.

Posteriormente, se llevaron a cabo las reacciones con DNA genómico de hámster. El gen  $\beta$ -actina fue incluido como un control positivo además de que sirvió como normalizador para la comparación del nivel de transcripción de los receptores de quimiocinas.

Una vez lograda la amplificación con DNA genómico de hámster, los productos de PCR se purificaron utilizando el paquete comercial QIAquick® (QIAGEN®) y posteriormente se mandaron al Instituto de Biotecnología de la UNAM para su secuenciación automatizada con fluorescencia mediante Taq FS Dye Terminator Cycle®; con el equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems modelo 3730®.

Los resultados de las secuencias fueron analizados mediante el programa Sequencher® 4.2 (Gen Codes Corporation®). Los fragmentos de las secuencias en donde las bases obtenidas tanto con iniciador sentido y el antisentido fueron idénticas, fueron comparados con el programa BLAST a los genes de otras especies, comprobando su identidad como receptores de quimiocinas y FPR1. Posteriormente, se diseñaron iniciadores específicos (cuadro 2).

Se amplificaron los fragmentos de receptores quimiotácticos con los iniciadores específicos a partir de DNA genómico de hámster, para estandarizar las condiciones que fueron utilizadas en la RT-PCR. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 10 µl [3 µl de agua DEPC, 5 µl de Master Mix 2x SYBR® Green (Roche®), 0.5 µl del iniciador en sentido (5 pM), 0.5 µl del iniciador en antisentido (5 pM) y 1 µl de DNA]. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 95° por 10 min seguido por 40 ciclos de amplificación (Desnaturalización 94° C por 10 s, alineamiento 60°C por 15 s, extensión 72°C por 20 s) y una extensión final 72° por 10 min.

**Bacterias.** Para el presente estudio fue utilizada la cepa virulenta LOCaS46 de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola<sup>(23)</sup> y su derivado no virulento, proporcionadas por el Grupo de Investigación en *Leptospira* y Leptospirosis (GrILLeP) del CEIEPAA, FMVZ-UNAM. La virulencia de esta cepa ha sido mantenida a través de

pases en hámsteres y la DL 50% calculada es de 5 bacterias. Mientras que la atenuación de dicha virulencia se realizó mediante 8 pases sucesivos *in vitro*.

**Activación de la virulencia y verificación de la no virulencia de las variantes de la cepa LOCaS46 de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola.** Dos semanas antes de iniciar el experimento, se tomaron 0.5 ml del tubo (del anillo de Dinger) que contenía a la cepa virulenta LOCaS46 y se realizó una infección vía intraperitoneal en 2 hámsteres (hembras, 3 semanas de edad, peso 40 gramos). Los hámsteres murieron a los 7 días post infección, con lo cual se comprobó la virulencia de la bacteria.

Una vez que murieron los animales, se procedió a realizar la necropsia en condiciones asépticas y se recuperó el microorganismo de forma estéril en medio líquido EMJH, a partir de hígado riñón, sangre y orina de dichos animales. Los tubos fueron incubados a una temperatura de 30°C, mostrando señales de desarrollo y verificando mediante microscopía de campo oscuro la presencia de *Leptospira*. A partir de estos aislados, se realizó el experimento de infección de hámsteres con la variante virulenta.

El derivado no virulento se obtuvo a través de 8 subcultivos en medio Fletcher y la falta de virulencia fue verificada por el GrILLeP. La presencia y viabilidad de la bacteria se verificó por microscopía de campo oscuro.

**Conteo bacteriano.** El cálculo de las concentraciones bacterianas fue realizado en una cámara de Neu Bauer® con un microscopio de campo oscuro Carl Zeiss®. Las bacterias fueron diluidas en medio EMJH a una concentración de  $1 \times 10^3$  por ml para la cepa virulenta y su derivada no virulenta.

**Modelo animal.** En el diseño experimental de este estudio se utilizaron 60 hámsteres sirios dorados (*Mesocricetus auratus*), hembras de 8 a 10 semanas de edad libres de patógenos específicos, los cuales se adquirieron del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Xochimilco.

En el presente estudio se formaron 3 grupos de 20 animales cada uno, el primero fue inoculado con la cepa virulenta ( $1 \times 10^3$  bacterias), el segundo se inoculó con la cepa no virulenta ( $1 \times 10^3$  bacterias), y el tercero se inoculó con 1 ml de medio EMJH estéril (Cuadro 3). Todos los animales fueron inoculados por vía intraperitoneal (IP).

Cinco hámsteres de cada grupo fueron sacrificados a las 24, 48, 96 y 192 h (excepto los animales del grupo inoculado con la cepa virulenta, de los cuales murieron 4 a las 144 h y se sacrificó al restante a ese mismo tiempo) por sobredosis de pentobarbital sódico IP (200 mg/kg de peso vivo).

Una vez sacrificados los animales, se tomaron muestras (hígado, pulmón y riñón) para el aislamiento bacteriano; además de colectar tejido (pulmón y riñón) para la extracción de RNA.

**Recuperación del microorganismo.** La recuperación del microorganismo a partir de hígado, pulmón y riñón de cada uno de los animales, se realizó por inoculación de manera estéril en tubos con medio de cultivo Fletcher<sup>(23)</sup> y fueron incubados a 30° C. Una vez que se observó el desarrollo característico en forma de anillo de Dinger en los tubos (7 a 12 días), los cultivos fueron observados por microscopía de campo oscuro para comprobar la presencia del microorganismo.

**Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA.** El aislamiento de RNA, se realizó a partir pulmón y riñón de cada uno de los hámsteres, obteniendo un total de 120 muestras

utilizando, 500  $\mu$ L Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>) para 50 mg de tejido, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Debido a que los receptores de quimiocinas y FPR1 carecen de intrones, para evitar cualquier amplificación debida a la presencia de DNA genómico, el RNA extraído fue tratado con DNase I<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para dicho tratamiento, a cada una de las muestras se le determinó la concentración de RNA en un espectrofotómetro (nanodrop), utilizando 1  $\mu$ g de RNA; por lo que se utilizó un volumen final de 11  $\mu$ l a una concentración de 90 ng de RNA total por  $\mu$ l. Posteriormente se procedió a realizar la síntesis de cDNA, para cada una de las muestras, mediante oligo (dt) utilizando el paquete comercial Superscript<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>), siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 5  $\mu$ L (450 ng) de los RNA tratados con DNase I<sup>®</sup>.

**RT-PCR y análisis de resultados.** Una vez sintetizado el cDNA de cada una de las muestras, se formaron alícuotas (1  $\mu$ L) de cada uno de los cDNA, para posteriormente llevar a cabo la RT-PCR. Con el objetivo de evaluar la calidad del cDNA, se realizaron las RT-PCR de todas las muestras para el gen  $\beta$ -actina; sólo a las muestras que amplificaron con este gen, se les realizó la RT-PCR con los iniciadores específicos de los receptores quimiotácticos.

Para la evaluación de la transcripción, se tomaron 5  $\mu$ l de cada una de los productos de la RT-PCR y se mezclaron con 2  $\mu$ l de amortiguador de corrida, las muestras se colocaron en geles de agarosa al 2% y se sometieron a electroforesis (100 voltios, 90 miliamperes) por 45 minutos, posteriormente se tiñeron en una solución de bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos. Se llevó a cabo la digitalización de cada uno de los geles en el fotodocumentador MiniLumi 1.4<sup>®</sup> (DNR *Bio-Imaging Systems Ltd*)

utilizando el programa *GelCapture*<sup>®</sup>. Posteriormente, se evaluó semicuantitativamente la densidad óptica de cada uno de los productos de la RT-PCR. Para la evaluación de la intensidad de los transcritos, se utilizó el paquete de cómputo *ImageJ*<sup>®</sup> v 1.44, normalizando el valor de cada uno de los receptores quimiotácticos con el valor para el gen  $\beta$ -actina respectivo. Adicionalmente, se analizaron los valores de la transcripción de los receptores quimiotácticos en los hámsteres infectados con la variante virulenta o la no virulenta en relación a los valores de los animales testigo. El análisis estadístico de estos resultados se realizó con el paquete de cómputo SPSS<sup>®</sup> 16.0 mediante la prueba no paramétrica de Kluskal-Wallis y posteriormente la prueba U de Mann-Whitney; se consideraron como significativos aquellos resultados que tuvieran una  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

**Estandarización de la PCR con iniciadores degenerados.** Preliminar a la amplificación de los genes en el hámster, se estandarizó la PCR con los iniciadores degenerados, para CCR1, CCR2 CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 y FPR1 con DNA genómico de ratón (Figuras 1 y 2). Posteriormente se amplificaron los receptores CCR1, CCR5, CXCR2 y CX3CR1 con DNA genómico de hámster (Figura 3).

En la PCR para FPR1, con la temperatura de alineación de 55°C, aparecían tres bandas en el gel de agarosa (Figura 4 (A)), por lo que se optó por utilizar una temperatura de 57.5°C, con la cual amplificó exclusivamente la banda con el peso molecular correcto (851bp). (Figura 4 (B))

Los receptores de quimiocinas CCR2 y CXCR3, mostraron bandas inespecíficas a una temperatura de 55°C por lo que se realizó una PCR de gradiente para tratar de eliminarlas; aún con el incremento de la temperatura, siguieron persistiendo varias bandas hasta que se llegó a temperaturas (67°C para CCR2 y 68.2°C para CXCR3) en las cuales, ya no se logró la amplificación de producto alguno (Figura 5); por lo que se decidió secuenciar solo los receptores en los cuales se obtuvo el amplicón con el peso molecular correcto.

**Secuenciación.** Se logró la amplificación parcial por PCR de los genes quimiotacticos CCR1, CCR5, CXCR2, CX3CR1 y FPR1 a partir de DNA genómico de hámster (*Mesocricetus auratus*) y los productos de PCR purificados fueron secuenciados por el IBT-UNAM.

Una vez obtenida la secuencia preliminar, se procedió a su análisis con el software Sequencher, obteniendo la secuencia revisada de fragmentos de CCR1, CCR5, CXCR2, CX3CR1 y FPR1 de 402 bp, 566 bp, 728 bp, 635 bp, 791 bp; respectivamente.

Posteriormente, estas secuencias fueron publicadas en el *GeneBank* y actualmente se encuentran disponibles con los siguientes números de acceso: JQ013100.1 (CCR1), JQ013101.1 (CCR5), JQ013102.1 (CXCR2), JQ013103.1 (CX3CR1), JQ013104.1 (FPR1).

La homología de la secuencia de nucleótidos para estos genes quimiotácticos del hámster (*Mesocricetus auratus*) con las secuencias correspondientes a ratón y rata; fue determinada mediante su alineamiento, utilizando el programa *Clustal W*. Para CCR1, la homología fue de 80% con respecto a la de la secuencia del ratón y 82% con respecto a la de la rata. El gen CCR5 mostró una homología de 94% y 92% a las secuencias del ratón y rata respectivamente. El receptor CXCR2 tuvo una homología de 87% con la secuencia del ratón y de 84% con la de la rata. En el caso de CX3CR1, la homología de su secuencia fue de 90% y 89% comparada con ratón y rata, respectivamente. Por último, FPR1 mostró una homología de 87% y 85% comparada con las secuencias de ratón y rata, respectivamente.

Debido a que durante la escritura de este trabajo fueron publicadas en el *GenBank* las secuencias de los genes correspondientes de hámster chino (*Cricetulus griseus*), por otro grupo de investigación (ver número de acceso *GeneBank*), las secuencias obtenidas en este estudio se compararon con las del hámster chino. Los porcentajes de homología son los siguientes: 95% para CCR1, 94% para CCR5, 95% para CXCR2, 93% para CX3CR1 y 93% para FPR1 (Cuadro 4).

Después de analizar las secuencias, se diseñaron iniciadores específicos (Cuadro 2) para CCR1, CCR5, CXCR2, CX3CR1 y FPR1; con el fin de comprobar su funcionalidad, se desarrolló una PCR con DNA genómico de hámster (Figura 6).

**Aislamiento e infección experimental.** Los animales del grupo testigo sin infectar, así como los infectados con la variante no virulenta de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola, durante los cuatro muestreos no mostraron signos de enfermedad, así como tampoco mostraron algún tipo de lesión en los órganos blanco a la disección. Con respecto a los animales infectados con la variante virulenta de *Leptospira*, no mostraron signos de enfermedad durante los muestreos de las 24, 48 y 96 h; en contraste a las 144 h, 4 animales presentaron muerte súbita; se decidió sacrificar al quinto animal de este grupo (200 mg/kg de peso vivo de pentobarbital sódico IP), el cual se notaba aparentemente sano. Una vez realizada la disección de cada uno de éstos animales, se observaron varias lesiones macroscópicas en los principales órganos blanco (Figura 7), incluso en el animal que fue sacrificado.

El hígado, los pulmones y riñones de cada uno de estos animales se encontraron congestionados; además de contar con hemorragias de tipo petequeal y difusas (40 a 60%) en la superficie de los órganos. En algunos casos, la vejiga se encontró plétora con orina de color rojo (hematuria/hemoglobinuria).

La recuperación de *Leptospira* se realizó a partir de hígado, pulmón y riñón en medio Fletcher <sup>(11)</sup>. Se confirmó mediante microscopía de campo oscuro la presencia de la bacteria en los tubos que presentaron anillo de Dinger 7 a 12 días post-incubación. En los muestreos del grupo infectado con la variante virulenta realizados a las 48, 96 y 144 h se logró la mayor cantidad de aislados bacterianos por animal (5/5); mientras que en el muestreo de las 24 h en éste mismo grupo, el aislamiento fue 4/5. Por otra parte, en el caso de los animales del grupo infectado con la variante no virulenta, los aislados logrados fueron 2/5, 4/5, 2/5 y 3/5 en los muestreos realizados a las 24, 46, 96 y 192 h, respectivamente.

Los tubos que no presentaron formación del anillo de Dinger después de 15 días post-incubación, se siguieron incubando a 30°C, y se observaron en campo oscuro a los 60 días post-incubación, cuando no se logró observar la bacteria, se consideraron negativos al aislamiento (Cuadro 5).

## **Resultados de la transcripción de receptores quimiotácticos.**

**La transcripción de CCR1 en el grupo infectado con la variante virulenta aumentó a las 144 h postinfección en pulmón y riñón.** Los niveles de transcripción para CCR1 en pulmón y riñón a las 24, 48 y 96 horas no muestran una tendencia clara debida a la infección por *Leptospira*, pero básicamente la transcripción de este receptor en los animales infectados, se encuentra por debajo o en el mismo nivel que los animales testigo. Sin embargo, a las 144 h post-infección en el grupo infectado con la variante virulenta, se observa un incremento en los niveles de transcripción, tanto en pulmón como en riñón (Figuras 8 y 9), aunque solo en este último sus valores son estadísticamente significativos ( $P < 0.021$ ).

**El receptor CCR5 se expresó de manera constitutiva con una ligera desviación en los grupos infectados.** Se observó que el mRNA de CCR5, a diferencia de los otros receptores, aparecía de manera constante en pulmón y riñón de los animales del grupo testigo, y en cada uno de los dos grupos infectados; por lo cual, estos resultados indican que CCR5 en el hámster se expresa de manera constitutiva. Sin embargo, a las 144 h en riñones del grupo infectado con la variante virulenta muestran un incremento ( $P < 0.014$ ) con respecto al grupo infectado con la variante no virulenta, mientras que en el grupo

infectado con la variante no virulenta se observa una disminución de 0.5 veces ( $P<0.027$ ) con respecto al grupo testigo (Figura 9).

***Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 en su forma virulenta aumenta la transcripción de CXCR2 en pulmón y riñón.** Los hámsteres de los grupos infectados, mostraron una menor transcripción de CXCR2 respecto al grupo testigo a las 24, 48 y 96 h, periodos en los cuales solo fueron estadísticamente significativos en riñón a las 24 h PI para el grupo infectado con la variante no virulenta ( $p<0.05$ ) y en pulmón a las 48 h para el grupo infectado con la variante virulenta ( $p<0.05$ ). Por otra parte, en ese mismo grupo, en los muestreos realizados a las 144 h, los niveles de transcripción en pulmón y riñón se incrementaron 9 y 5 veces ( $p<0.034$  y  $p<0.021$ , respectivamente) en relación al grupo testigo correspondiente. De la misma manera, el grupo infectado con la variante virulenta dentro de las 144 h presenta una mayor transcripción en pulmón ( $p<0.034$ ) y en riñón ( $p<0.014$ ) en relación a sus respectivos grupos infectados con la variante no virulenta (Figuras 8 y 9).

**La transcripción de CX3CR1 en pulmón aumentó a las 144 h PI en los pulmones y riñones del grupo infectado con la variante virulenta.** Los niveles de transcripción en los animales infectados para el receptor CX3CR1 durante los primeros muestreos presentan valores, cuya tendencia es relativamente menor en relación al grupo testigo. Dichos valores fueron estadísticamente significativos a las 24 h en el grupo infectado con la variante virulenta en riñón ( $p<0.009$ ) y a las 48 h en pulmón ( $p<0.05$ ). A las 96 h el grupo infectado con la variante no virulenta muestra una menor transcripción ( $p<0.047$ ) en relación al grupo testigo. En contraste, a las 144 h, los niveles de transcripción se encontraron incrementados en el grupo infectado con la variante

virulenta 15.7 veces en pulmón ( $p < 0.034$ ) y 8.5 veces en riñón ( $p < 0.043$ ), comparados con el grupo testigo. De la misma manera, los animales del grupo infectados con la variante no virulenta presentan una diferencia estadística comparados a las 144 h con el grupo infectado con la variante virulenta, en pulmón ( $p < 0.034$ ) y riñón ( $p < 0.014$ ) (Figuras 8 y 9).

**La transcripción de FPR1 en pulmón y riñón se incrementó desde las 96 h PI.** En general, la transcripción de FPR1 se muestra relativamente por debajo de los niveles basales, destacando la menor transcripción en los grupos infectados con las variantes virulenta ( $p < 0.009$ ) y no virulenta ( $p < 0.014$ ) a las 24 h PI en riñón, y a las 48 h para el grupo infectado con la variante virulenta en pulmón ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, a partir de las 96 h PI se observa una tendencia al incremento en la transcripción en ambos órganos de los animales infectados. A las 144 h, el grupo infectado con la variante virulenta presenta un incremento de 2.6 veces en pulmón ( $p < 0.034$ ), mientras que en riñón también muestra una tendencia a aumentar en relación al grupo testigo, sin embargo su valor no fue estadísticamente significativo (Figuras 8 y 9).

## DISCUSIÓN

El hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) es el principal modelo para el estudio de la leptospirosis aguda, debido a que reproduce ésta presentación clínica en humanos (enfermedad de Weil). Sin embargo, debido a que no ha sido secuenciado completamente su genoma, sólo se conocen algunos genes de su sistema inmune. La investigación de la respuesta inmune innata y adquirida a *Leptospira* es limitada por la falta de este conocimiento. Se ha establecido que los TLR's son capaces de reconocer los PAMP's; en el caso de *Leptospira* su lipopolisacarido es reconocido vía TLR2 induciendo un incremento en la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (24, 33).

Las quimiocinas en las que se ha observado un incremento en su expresión, ya sea *in vitro* por PME de *Leptospira* o *in vivo* mediante la infección por leptospirosis vivas en modelos diferentes al hámster: son CCL2, CCL3, CXCL1, CXCL2 y CXCL8 (34, 37). En cuanto a la expresión de quimiocinas en hámster únicamente se ha explorado la participación de CCL3 y CXCL10 en la infección experimental con *Leptospira* (38, 39).

El tránsito leucocitario es regulado a través de los receptores de quimiocinas en respuesta a la expresión de sus ligandos, en los sitios de inflamación (40-43). Existe redundancia en el sistema de quimiocinas y sus receptores de manera tal que, más de una quimiocina pueden activar un receptor y más de un receptor puede ser activado por una quimiocina (45). Los receptores de quimiocinas y FPR1, juegan un papel central en la defensa del huésped ante infecciones bacterianas promoviendo la migración, activación y degranulación leucocitarias (44, 45, 52). Hasta el momento no se había explorado su participación ante la infección por *Leptospira*.

El análisis *in silico* de los alineamientos para cada uno de los receptores entre rata y ratón (además de conejo para CCR1), permitió localizar regiones conservadas entre las

secuencias parálogas de los receptores que fueron utilizadas para el diseño de iniciadores degenerados considerando la variabilidad interespecie.

La alta conservación en la secuencia entre los receptores acoplados a proteínas G, que en el caso de los receptores de quimiocinas puede llegar hasta el 80% de identidad en aminoácidos <sup>(110)</sup>, permitió la amplificación y la posterior secuenciación de CCR1, CCR5, CXCR2, CX3CR1 y FPR1. En contraste, este mismo nivel de conservación, impidió la amplificación de un solo producto de PCR para CCR2 y CXCR3 de manera específica.

Los resultados de la secuenciación y el posterior alineamiento de las secuencias de los receptores quimiotácticos con sus parálogos en rata, ratón y hámster chino, mostró una alta homología. La traducción *in silico* de la secuencia permitió la localización de variaciones en el motivo DRYLAIVHA, característico de los receptores de quimiocinas <sup>(45)</sup>, además de que en FPR1 se localizó el motivo DRC, característico de esta familia de receptores <sup>(49)</sup>. Con base en este análisis y a su alineamiento con *BLAST*, se corroboró su identidad como receptores de quimiocina y FPR1.

Por otra parte, con relación al aislamiento bacteriano; en los animales del grupo infectado con la variante virulenta muestreados a las 48, 96 y 144 h, se logró recuperar la bacteria en medio Fletcher en el 100% de los animales; sin embargo, en el muestreo de las 24 h para ese mismo grupo fue menor (80%). En relación con los animales del grupo infectado con la variante no virulenta el porcentaje de aislados estuvo en un rango de 40 a 80%. El aislamiento bacteriano es la prueba diagnóstica definitiva pero sus principales desventajas en el caso de *Leptospira* son el lento desarrollo y un porcentaje bajo de efectividad que se encuentra entre el 11 y el 17% <sup>(8,111)</sup>.

Con respecto a la transcripción de los receptores quimiotácticos, este estudio sugiere que CCR1 participa en la respuesta inmune en los riñones ante la infección por la

variante virulenta de *Leptospira*, aunque en el caso de los pulmones los resultados no fueron estadísticamente significativos; es interesante que el patrón de transcripción sea muy similar al que ocurre a las 48, y 144/192 h PI en el riñón, órgano en el cuál la diferencia en los infectados con la variante virulenta fue estadísticamente significativa.

La expresión de CCL3 ante la infección por *Leptospira* <sup>(36, 39)</sup>, sustentan de manera indirecta el aumento en la transcripción de CCR1 que ocurre a las 144 h en el grupo infectado con la variante virulenta.

En la infección por *Leptospira* se ha reportado un aumento en la expresión de CCL2 <sup>(34, 35, 36)</sup> y CCL3 <sup>(36, 39)</sup>; de la misma manera Xu *et al* en 2007 <sup>(112)</sup> reportaron que en el modelo murino de infección corneal por *Pseudomonas aureoginosa* se expresa CCL2, CCL3, y CCR1 y que la infiltración de polimorfonucleares, es a través de CCR1. También reportan que la inhibición de estas quimiocinas mediante anticuerpos específicos reduce notablemente el daño en éste tejido en comparación con los animales testigo.

Es interesante notar que en esta investigación, se observó que el receptor CCR5 se expresa de manera constitutiva. La expresión de CCR5 de manera constitutiva ha sido informada por Demoule *et al* en 2009, <sup>(113)</sup> quienes lo encontraron expresado en el diafragma de ratones C57BL/6. Por otra parte, la línea celular J774 muestra niveles constitutivos de mRNA para CCR1 y CCR5 (Anders *et al* 2003) <sup>(114)</sup>. Similarmente, en humano, CCR5 se ha encontrado de manera constitutiva asociado a CD4 funcionando como correceptor viral del VIH <sup>(90)</sup>.

En cuanto al nivel de transcripción de CCR5 encontrado en este estudio, exceptuando a los riñones de los animales infectados con la variante no virulenta a las 192 h PI, en los cuales ocurrió una disminución estadísticamente significativa; éste receptor prácticamente se observa dentro de los niveles basales constitutivos.

Se ha establecido que la respuesta a CCL3 es a través de CCR1 y de CCR5. En 2001, Lindell *et al.* <sup>(115)</sup> observaron que la producción de CCL3 es crítica para la activación de macrófagos alveolares en el control de *Klebsiella pneumoniae* y que esta respuesta es regulada por CCR1 y no por CCR5. De la misma manera, debido a la poca variación observada en los niveles de transcripción de CCR5 en el presente estudio, se sugiere que es CCR1 el receptor que responde ante la inducción de la expresión de CCL3 por *Leptospira* <sup>(112)</sup>, aunque la expresión de ésta quimiocina no fue determinada en este estudio.

El receptor CXCR2 ha mostrado participar en la respuesta ante infecciones bacterianas como borreliosis. En el caso de la enfermedad de Lyme, Ritzman *et al.* (2012) <sup>(116)</sup> observaron que ratones infectados con *Borrelia burgdorferi*, expresan la quimiocina CXCL1 (CK), la cual es crítica para el desarrollo de las formas articular y cardíaca de la enfermedad, ya que promueve el reclutamiento de neutrófilos vía CXCR2. En contraste, ratones CXCL1 -/- exhiben una patología atenuada. Con respecto al receptor CXCR2, se ha visto que ratones CXCR2 -/- infectados con *Borrelia burgdorferi* presentan una disminución significativa en el desarrollo de la patología <sup>(117)</sup>.

Las quimiocinas CXCL8 (IL-8), CXCL1 y CXCL2 presentan alta afinidad por el receptor CXCR2 <sup>(45)</sup>. En el presente estudio, se observó un incremento que fue significativo en el nivel de transcripción de CXCR2 tanto en pulmón como en riñón a las 144 h PI en los animales del grupo infectado con la variante virulenta. Éstos resultados son compatibles con la participación de sus ligandos específicos CXCL1, CXCL2 y CXCL8, en respuesta a *Leptospira*, que ha sido informada por otros grupos <sup>(34-37, 118)</sup>.

El receptor CX3CR1 presenta alta afinidad por su ligando CX3CL1 (fractalina). El principal órgano blanco de *Leptospira* es el riñón, donde produce una nefritis

intersticial. Se ha observado la sobreexpresión de CX3CL1 y de su receptor en un modelo de glomerulonefritis <sup>(108)</sup>, en donde el bloqueo de CX3CR1 inhibe la infiltración leucocitaria en el glomérulo mejorando la función renal. Con base en esto se decidió explorar la posible participación de CX3CR1 en la infiltración leucocitaria asociada al daño renal. Los resultados muestran que la transcripción tanto en riñones como en pulmones a las 144 h del grupo infectado con la variante virulenta, se encuentra aumentada de manera significativa, lo que sugiere que la presencia de *Leptospira* induce la transcripción de CX3CL1, lo que a su vez estimula la producción de CX3CR1, causando un aumento en la infiltración leucocitaria, que puede estar implicada directamente en el daño ocasionado a los tejidos.

Hasta la fecha, se desconoce la posible participación de FPR1 en respuesta a la infección por *Leptospira*. En el presente estudio se encontró que existe un aumento en el nivel de transcripción significativo a las 144 h PI en los pulmones del grupo infectado con la variante virulenta, y aunque en los riñones de este mismo grupo se observa un patrón similar en la expresión a partir de las 48 h, los resultados no fueron significativos. Sin embargo, debido a que previamente se ha demostrado que la afinidad de FPR1 es tanto por péptidos formilados exógenos como endógenos, cabe la posibilidad de que el aumento en la transcripción de FPR1 en el grupo infectado con la variante virulenta observada a las 144 h, se deba también al daño tisular por la presencia de *Leptospira*, así como a su replicación <sup>(48, 60)</sup>.

En este trabajo no se logró amplificar a los receptores CCR2 y CXCR3, por lo que no se pudo examinar la posible participación de éstos; sin embargo, la sobreexpresión de su ligandos de alta afinidad CCL2 y CXCL10 demostrada en hámsteres <sup>(38, 39)</sup> y en otros modelos <sup>(119, 120)</sup> apunta a una sobreexpresión de CCR2 y CXCR3.

La infiltración leucocitaria a través de los receptores de quimiocina y FPR1 establecen la primera línea de defensa del organismo ante infecciones, pero en muchas ocasiones, este tipo de respuesta no es la adecuada para el patógeno. En el caso de *Leptospira*, se ha hecho evidente que la fagocitosis a través de neutrófilos y macrófagos es más efectiva si el patógeno es opsonizado por una IgG específica <sup>(27,28)</sup>. Lo anterior sugiere que la sobreexpresión de quimiocinas, así como de los receptores de quimiocinas proinflamatorias y FPR1 en los órganos blanco, promueven el daño tisular, a través de la quimioatracción de neutrófilos y macrófagos debido a una fagocitosis poco efectiva antes de la aparición de la respuesta humoral.

Por otra parte, mientras los medicamentos antiinflamatorios impiden la movilización de los subconjuntos de leucocitos de una manera no selectiva, el desarrollo de inhibidores de quimiocina/receptores de quimiocina podría permitir una inhibición selectiva con mayores beneficios y menores efectos adversos <sup>(121, 122)</sup>.

## CONCLUSIONES

En este estudio se reporta por primera vez la secuencia parcial de los receptores quimiotácticos CCR1, CCR5, CXCR2, CX3CR1 y FPR1 del hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*).

La infección experimental de hámsteres con la cepa virulenta de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46, demostró que ésta tiene un alto grado de patogenicidad; reflejada en el mayor porcentaje de aislados, así como en las lesiones producidas.

En hámster sirio dorado controla la infección por la derivada no virulenta de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCas46; por lo que, la recuperación del microorganismo fue menor, además de no producir lesiones en los órganos blanco.

Se observó que la expresión del receptor de quimiocina CCR5 ocurre de manera constitutiva en pulmón y riñón de hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*).

El aumento del nivel de transcripción de CCR1 en riñón, así como su tendencia a aumentar en pulmón, sugiere que es este receptor y no CCR5 el que responde a la quimiocina CCL3 en la leptospirosis.

Las lesiones presentadas en los órganos blanco, así como la inducción de los receptores quimiotácticos (CCR1, CXCR2, CX3CR1 y FPR1), fue relativamente mayor en los animales del grupo infectado con la variante virulenta, lo cual sugiere que éstos receptores son responsables de promover la infiltración leucocitaria y el daño tisular observado.

Por lo tanto los resultados concuerdan con la hipótesis planteada originalmente, ya que se demostró que la infección con *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola en su forma virulenta indujo un mayor nivel de transcripción comparado con su variante no virulenta y los animales testigo.

El presente trabajo muestra por primera vez la participación de receptores quimiotácticos en la infección experimental de hamsterés con *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46.

Se requiere de investigación adicional para confirmar que la sobreexpresión de estos receptores está relacionada con la severidad de la leptospirosis, así como las posibles aplicaciones clínicas de su inhibición selectiva, con el objetivo mejorar el pronóstico de la enfermedad.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Adler B, Lo M, Seemann T, Murray G. Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. *Vet microbiol* 2011;153(1-2):73–81.
2. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(2):296-326.
3. Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci* 2008;33(4):557-69.
4. Bulach DM, Kalambaheti T, De la Peña-Moctezuma A, Adler B. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. *J Mol Microbial and Biotech* 2002;2(4):376-380.
5. Institute Pasteur [homepage on the Internet]. *Leptospira* molecular biology home page [updated 2006 Jun 26; cited 2012 May 07]. Available from: <http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Strains.html>
6. Galloway RL, Levett PN. Evaluation of a modified pulsed-field gel electrophoresis approach for the identification of *Leptospira* serovars. *Am J trop Med Hyg* 2008;78(4):628-632.
7. 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;40(1):189-199.
8. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis 2a ed. Melbourne, Australia: Medisci, 1999.
9. Yanagawa R, Faine S. Morphological and serological analysis of leptospiral structure. *Nature* 1996;211(5051):823-826.
10. Palmer MF. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *Medical Laboratory Sciences* 1988;45(2):174-178.

11. Adler B, De la Peña-Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 2010;140(3–4):287–296.
12. Haake, DA. *Curr Protoc Microbiol* 2006. Vol. Chapter 12. Hamster model of leptospirosis.
13. Silva EF, Santos CS, Athanzio DA, *et al.* Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. *Vaccine* 2008;29(31):3892–3896.
14. Truccolo J, Charavay F, Merien F, Perolat P. Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. *Antimicrob Agents. Chemother* 2002;46(3):848–853
15. Bolin CA, Alt DP. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Am J Vet Res Microbiol* 2001;62(7):995-1000.
16. Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE. Host-patogen interactions in the kidney during chronic Leptospirosis. *Vet Pathol* 2009;46(5):792-799.
17. Tangkanakul W, Tarmapornpil P, Plicaytis BD, Bragg S, Poonsuksombat D, Choomkasein P. *et al.* Risk factors associated with Leptospirosis in northeastern Thailand 1998. *Am J Trop Med Hyg* 2000;63(3-4):204-208.
18. Radolf JD. Role of outer membrane architecture in immune evasion by *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi*. *Trends Microbiol* 1994;2(9):307-311.
19. Haake DA, Walker EM, Blanco DR, Bolin CA, Miller JN, Lovett MA. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar Grippityphosa during in vitro cultivation. *Infect Immun* 1991;59(3):1131-1140.
20. Adler B, De la Peña-Moctezuma A. *Leptospira*. in: *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2004. Blackwell Publishing.

21. Schelotto F, Hernández E, González S, Del Monte A, Ifran S, Flores K, Pardo L, Parada D, Filippini M, Balseiro V, Geymonat JP, Varela G. A ten-year follow-up of human leptospirosis in Uruguay: an unresolved health problem. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2012;54(2):69-76.
22. Chih-Wei Yang, Mai-Szu Wu, Ming-Jeng Pan. Leptospirosis renal disease. *Nephrol Dial transplant* 2001;16(Suppl. 5):73-77.
23. Castillo SLO. Detección de perros portadores de leptospiras patógenas: estudios bacteriológico, serológico y molecular (Tesis de licenciatura) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
24. Yang CW. Leptospirosis renal disease: understanding the initiation by toll-like receptors. *Kidney Int* 2007;72(8):918–925.
25. Jost BH, Adler B, Vinh T, Faine S. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. *J Med Microbiol* 1986;22(3):269–275.
26. Palaniappan R, Ramanujam S, Chang Y. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis* 2007;20(3):284–292.
27. Wang B, Sullivan JA, Sullivan GW, Mandell GL. Role of specific antibody in interaction of leptospire with human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun.* 1984;46(3):809–813.
28. Banfi E, Cinco M, Bellini M, Soranzo MR. The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospire. *J Gen Microbiol* 1982;128(4):813–816.
29. Malkin K. Enhancement of *Leptospira* Hardjo agglutination titers in sheep and goat serum by heat inactivation. *Can J Comp Med* 1984; 48(2):208-210.

30. Cinco M, Cini B, Perticarari S, Presani G. *Leptospira interrogans* binds to the CR3 receptor on mammalian cells. *Microb Pathog* 2002;33(6):299–305.
31. Lingappa J, Kuffner T, Tappero J, Whitworth W, Mize A, Kaiser R, McNicholl J: HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water: possible geneenvironment interaction in an outbreak of leptospirosis. *Genes Immun* 2004;5(3):197–202.
32. Radaelli E, Del Piero F, Aresu L, Sciarrone F, Vicari N, Mattiello S, Tagliabue S, Fabbi M, Scanziani E: Expression of major histocompatibility complex class II antigens in porcine leptospiral nephritis. *Vet Pathol* 2009;46(5):800-809.
33. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ: Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2001;2(4):346–352.
34. Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hong JJ, Yu CC, Vandewalle A, Huang CC: *Leptospira* outer membrane protein activates NF-kappaB and downstream genes expressed in medullary thick ascending limb cells. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(11):2017-2026.
35. Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hsieh WJ, Vandewalle A, Huang CC: The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(8):2037-2045.
36. Da Silva JB, Ramos TM, de Franco M, Paiva D, Ho PL, Martins EA, et al. Chemokines expression during *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni infection in resistant BALB/c and susceptible C3H/HeJ mice. *Microb Pathog* 2009;47(2):87-93.

37. Da Silva JB, Carvalho E, Covarrubias AE, Ching AT, Mattaraia VG, Paiva D, de Franco M, Fávaro RD, Pereira MM, Vasconcellos S, Zorn TT Ho PL Martins EA. Induction of TNF- $\alpha$  and CXCL-2 mRNAs in different organs of mice infected with pathogenic *Leptospira*. *Microb Pathog*. 2012;52(4):206-16.
38. Lowanitchapat, A, Payungporn S, Sereemasapun A, Ekpo P, Phulsuksombati D, Poovorawan Y, Chirathaworn C. Expression of TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IP-10 and IL-10 mRNA in kidneys of hamsters infected with pathogenic *Leptospira*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2010;33(5):423–434.
39. Matsui M, Rouleau V, Bruyère-Ostells L, Goarant C. Gene expression profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: Comparison between susceptible hamsters and resistant mice. *Infect Immun* 2011;79(11):4480-4492.
40. Migeotte Isabelle, Communi David, Parmentier Marc. Formyl peptide receptors: A promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17(6):501–519.
41. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel pro-inflammatory supergene “intercrine” cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991;9:617-648.
42. Le Y, Zhou Y, Iribarren P, Wang J. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol* 2004;1(2):95-104.
43. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997;90(3):909-928.
44. Sharma Monika. Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease. *Crit Rev Biotechnol* 2010;30(1):1–22.
45. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology

- XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52(1):1452–1476
46. IUIS/WHO subcommittee on chemokine nomenclature. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Cytokine* 2003;21(1):48–49.
47. Murphy PM, Charo IF, Hills R, Richard Horuk R, Matsushima K, Oppenheim JJ. Chemokine receptors, introductory chapter. [homepage on the internet], [updated 2009 Oct 13; cited 2012 Apr 07]. IUPHAR database (IUPHAR-DB) available from: <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=14>.
48. Rabiet MJ, Huet E, Boulay F. Human mitochondria-derived N-formylated peptides are novel agonists equally active on FPR and FPRL1, while *Listeria monocytogenes*-derived peptides preferentially activate FPR. *Eur J Immunol* 2005;35(8):2486–2495.
49. Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, Serhan CN, Murphy PM. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev*. 2009;61(2):119-61.
50. Mandal P, Novotny M, Hamilton TA. Lipopolysaccharide Induces Formyl Peptide Receptor 1 Gene Expression in Macrophages and Neutrophils via Transcriptional and Posttranscriptional Mechanisms. *J Immunol* 2005;175(9):6085-6091.
51. Migeotte I, Communi D, Parmentier M. Formyl peptide receptors: A promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17(6): 501–519.

52. Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 1994;12:593–633.
53. Gao JL, Chen H, Filie JD, Kozak CA, Murphy PM. Differential expansion of the N-formyl-peptide receptor gene cluster in human and mouse. *Genomics* 1998;51(2):270–276.
54. Sahagun-Ruiz A, Colla JS, Juhn J, Gao JL, Murphy PM, McDermott DH. Contrasting Evolution of the Human Leukocyte N-Formylpeptide Receptor Subtypes FPR and FPRL1R. *Genes Immun.* 2001;2(6):335-42.
55. Durstin M, Gao JL, Tiffany HL, McDermott D, Murphy PM. Differential expression of members of the N-formyl-peptide receptor gene cluster in human phagocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201(1):174–179.
56. Perez HD, Holmes R, Kelly E, McClary J, Chou Q, Andrews WH. Cloning of the gene coding for a human receptor for formyl peptides: characterization of a promoter region and evidence for polymorphic expression. *Biochemistry* 1992;31(46):11595–9.
57. Rovati GE, Capra V, Neubig RR. The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol* 2007;71(4):959–964.
58. Gao JL, Murphy PM. Species and subtype variants of the N-formyl peptide chemotactic receptor reveal multiple important functional domains. *J Biol Chem* 1993;268(34):25395–25401.
59. Ye RD, Quehenberger O, Thomas KM, Navarro J, Cavanagh SL, Prossnitz ER, Cochrane CG. The rabbit neutrophil N-formyl peptide receptor: cDNA cloning, expression, and structure-function implications. *J Immunol* 1993;150(4):1383–94.

60. Gao JL, Lee EJ, Murphy PM. Impaired antibacterial host defense in mice lacking the N-formylpeptide receptor. *J Exp Med* 1999;189(4):657-662.
61. Neote K, DiGregorio D, Mak JY, Horuk R, Schall TJ. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell* 1993;72(3):415-425.
62. Gong X, Gong W, Kuhns DB, Ben-Baruch A, Howard OM, Wang JM. Monocyte chemotactic protein-2 (MCP-2) uses CCR1 and CCR2B as its functional receptors. *J Biol Chem* 1997;272(18):11682-11685.
63. Sarau HM, Rush JA, Foley JJ, Brawner ME, Schmidt DB, White JR, Barnette MS. Characterization of functional chemokine receptors (CCR1 and CCR2) on EoL-3 cells: A model system to examine the role of chemokines in cell function. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283(1):411-418.
64. Coulin F, Power CA, Alouani S, Peitsch MC, Schroeder JM, Moshizuki M, Clark-Lewis I, Wells TN. Characterisation of macrophage inflammatory protein-5 human CC cytokine-2, a member of the macrophage inflammatory-protein family of chemokines. *Eur J Biochem* 1997;248(2):507-515.
65. Youn BS, Zhang SM, Broxmeyer HE, Cooper S, Antol K, Fraser M, Kwon BS. Characterization of CKbeta8 and CKbeta8-1: Two alternatively spliced forms of human beta-chemokine, chemoattractants for neutrophils, monocytes, and lymphocytes, and potent agonists at CC chemokine receptor 1. *Blood* 1998;91(9):3118-3126.
66. Pardigol A, Forssmann U, Zucht HD, Loetscher P, Schulz-Knappe P, Baggiolini M, Forssmann WG, Mägert HJ. HCC-2, a human chemokine: gene structure, expression pattern, and biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(11):6308-6313.

67. Youn B-S, Zhang SM, Lee EK, Park DH, Broxmeyer HE, Murphy PM, Locati M, Pease JE, Kim KK, Antol K, Kwon BS. Molecular cloning of leukotactin1: A novel human beta-chemokine, a chemoattractant for neutrophils, monocytes, and lymphocytes, and a potent agonist at CC chemokine receptors 1 and 3. *J Immunol* 1997;159(11):5205–5210.
68. Su SB, Mukaida N, Wang J, Nomura H, Matsushima K. Preparation of specific polyclonal antibodies to a C–C chemokine receptor, CCR1, and determination of CCR1 expression on various types of leukocytes. *J Leukoc Biol* 1996;60(5):658-666.
69. Koelink PJ, Overbeek SA, Braber S, Kruijf P, Folkerts G, Smit MJ, Kraneveld AD. Targeting chemokine receptors in chronic inflammatory diseases: an extensive review. *Pharmacol Ther* 2012;133(1):1-18.
70. Sozzani S, Luini W, Borsatti A, Polentarutti N, Zhou D, Piemonti L, D'Amico G, Power CA, Wells TN, Gobbi M, Allavena P, Mantovani A. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol* 1997;159(4):1993–2000.
71. Elsner J, Petering H, Hochstetter R, Kimmig D, Wells TN, Kapp A, Proudfoot AE. The CC chemokine antagonist Met-RANTES inhibits eosinophil effector functions through the chemokine receptors CCR1 and CCR3. *Eur J Immunol* 1997;27(11):2892–2898.
72. Gao JL, Wynn TA, Chang Y, Lee EJ, Broxmeyer HE, Cooper S, Tiffany HL, Westphal H, Kwon-Chung J, Murphy PM. Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. *J Exp Med* 1997;185(11):1959–1968.

73. Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, Coughlin SR. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(7):2752–2756.
74. Wong LM, Myers SJ, Tsou CL, Gosling J, Arai H, Charo IF. Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein 1 receptor gene: Evidence for the role of the carboxyl-terminal tail in receptor trafficking. *J Biol Chem* 1997;272(2):1038–1045.
75. Frade JM, Mellado M, del Real G, Gutierrez-Ramos JC, Lind P and Martinez-A C. Characterization of the CCR2 chemokine receptor: Functional CCR2 receptor expression in B cells. *J Immunol* 1997;159(11):5576–5584.
76. Rabin RL, Park MK, Liao F, Swofford R, Stephany D, Farber JM. Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *J Immunol* 1999;162(7):3840–50.
77. Johnston B, Burns AR, Suematsu M, Issekutz TB, Woodman RC, Kubes P. Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1. *J Clin Invest* 1999; 103(9):1269–1276.
78. Boring L, Gosling J, Monteclaro FS, Lulis AJ, Tsou CL, Charo IF. Molecular cloning and functional expression of murine JE\_monocyte chemoattractant protein 1 and murine macrophage inflammatory protein 1alpha receptors: evidence for two closely linked CC chemokine receptors on chromosome 9. *J Biol Chem* 1996; 271(13):7551-7558.
79. Granelli-Piperno A, Moser B, Pope M, Chen D, Wei Y, Isdell F, O’Doherty U, Paxton W, Koup R, Mojsov S, Bhardwaj N, Clark-Lewis I, Baggiolini M,

- Steinman RM. Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *J Exp Med* 1996;184(6):2433–2438.
80. Rubbert A, Combadiere C, Ostrowski M, Arthos J, Dybul M, Machado E, Cohn MA, Hoxie JA, Murphy PM, Fauci AS, Weissman D. Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as coreceptors for HIV entry. *J Immunol* 1998;160(8):3933–3941.
81. Ruiz ME, Cicala C, Arthos J, Kinter A, Catanzaro AT, Adelsberger J, Holmes KL, Cohen OJ, Fauci AS. Peripheral blood-derived CD34<sup>+</sup> progenitor cells: CXCR4 chemokine receptor 4 and CCR5 chemokine receptor 5 expression and infection by HIV. *J Immunol* 1998;161(8):4169–4176.
82. Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(5):1925–1930.
83. Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini, Dayer JM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998;391(6665):344–345.
84. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CCR5: A RANTES, MIP-1a, MIP-1b receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996; 272(5270):1955–1958.
85. Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, Mackay CR. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 1998;101(4):746–754.
86. Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, Manischewitz J, Golding H. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on

- human Langerhans cells and macrophages: Implications for HIV primary infection. *Nat Med* 1997;3(12):1369–1375.
87. Zhang L, He T, Talal A, Wang G, Frankel SS, Ho DD. In vivo distribution of the human immunodeficiency virus/simian immunodeficiency virus coreceptors: CXCR4, CCR3, and CCR5. *J Virol* 1998;72(6):5035–5045.
88. Nibbs RJ, Yang J, Landau NR, Mao JH, Graham GJ. LD78beta, a non-allelic variant of human MIP-1 alpha (LD78alpha), has enhanced receptor interactions and potent HIV suppressive activity. *J Biol Chem* 1999;274(25):17478–17483.
89. Blanpain C, Migeotte I, Lee B, Vakili J, Doranz BJ, Govaerts C, Vassart G, Doms RW, Parmentier M. CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood* 1999;94(6):1899–1905.
90. Xiao X, Wu L, Stantchev TS, Feng YR, Ugolini S, Chen H, Shen Z, Riley JL, Broder CC, Sattentau QJ, Dimitrov DS. Constitutive cell surface association between CD4 and CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(13):7496–7501.
91. Zhou Y, Kurihara T, Ryseck RP, Yang Y, Ryan C, Loy J, Warr G, Bravo R. Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J Immunol* 1998;160(8):4018–4025.
92. Huffnagle GB, McNeil LK, McDonald RA, Murphy JW, Toews GB, Maeda N, Kuziel WA. Role of C-C chemokine receptor 5 in organ-specific and innate immunity to *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 1999;163(9):4642-4646.
93. Chuntharapai A, Lee J, Hebert CA, Kim KJ. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. *J Immunol*. 1994;153(12):5682-5698.

94. Lee J, Horuk R, Rice GC, Bennett GL, Camerato T, Wood WI. Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *J Biol Chem* 1992;267(23):16283–7.
95. Bozic CR, Gerard NP, von Uexkull-Guldenband C, Kolakowski LF Jr, Conklyn MJ, Breslow R, Showell HJ, Gerard C. The murine interleukin-8 type B receptor homologue and its ligands. *J Biol Chem* 1994;269(47):29355–29358.
96. Lee J, Cacalano G, Camerato T, Toy K, Moore MW, Wood WI. Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor. *J Immunol* 1995; 155(4):2158–2164.
97. Cacalano G, Lee J, Kikly K, Ryan AM, Pitts-Meek S, Hultgren B, Wood WI, Moore MW. Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science* 1994;265(5172):682–685.
98. Eisele NA, Lee-Lewis H, Besch-Williford C, Brown CR, Anderson DM. Chemokine receptor CXCR2 mediates bacterial clearance rather than neutrophil recruitment in a murine model of pneumonic plague. *Am J Pathol* 2011;178(3):1190-200.
99. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998;187(1):129–134.
100. Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Chemokine receptor specific for IP10 and Mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184(3):963-969.

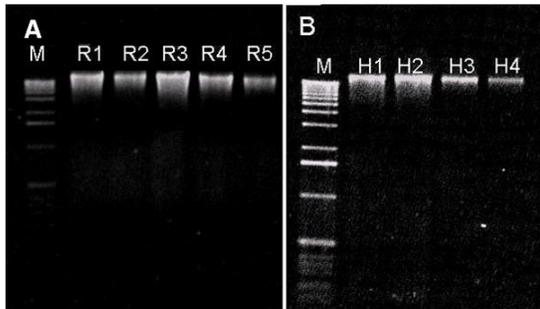
101. Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* 1993;177(6):1809-1814.
102. Liao F, Rabin RL, Yannelli JR, Koniaris LG, Vanguri P, Farber JM. Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 1995;182(5):1301-1314.
103. Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Neote K. Interferoninducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 1998;187(12):2009-2021.
104. Loetscher M, Loetscher P, Brass N, Meese E, Moser B. Lymphocytespecific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur. J. Immunol* 1998;28(11):3696–3705.
105. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997;385(6617):640-644.
106. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel DD. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med* 1998;188(8):1413-1419.
107. Kanazawa N, Nakamura T, Tashiro K, Muramatsu M, Morita K, Yoneda K, Inaba K, Imamura S, Honjo T. Fractalkine and macrophage-derived chemokine:

- T cell-attracting chemokines expressed in T cell area dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999;29(6):1925-1932.
108. Feng L, Chen S, Garcia GE, Xia Y, Siani MA, Botti P, Wilson CB, Harrison JK, Bacon KB. Prevention of crescentic glomerulonephritis by immunoneutralization of the fractalkine receptor CX3CR1. *Kidney Int* 1999;56(2):612–620.
109. Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res* 1979;6(11):3543-3557.
110. Murphy PM. chemokine receptors cloning strategies. *Methods* 1996;10(1):104-118.
111. Bharti A, Nally J, Ricaldi J, Matthias M, Diaz M, Lovett M, Levett P, Gilman R, Wililig M, Gotuzzo E, Vinetz J. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003;3(12):757-771.
112. Xue ML, Thakur A, Cole N, Lloyd A, Stapleton F, Wakefield D, Willcox MD. A critical role for CCL2 and CCL3 chemokines in the regulation of polymorphonuclear neutrophils recruitment during corneal infection in mice. *Immunol Cell Biol* 2007;85(7):525-531.
113. Demoule A, Divangahi M, Yahiaoui L, Danialou G, Gvozdic D, Petrof BJ. Chemokine receptor and ligand upregulation in the diaphragm during endotoxemia and *Pseudomonas* lung infection. *Mediators Inflamm* 2009;1-11.
114. Anders HJ, Banas B, Linde Y, Weller L, Cohen CD, Kretzler M, Martin S, Vielhauer V, Schlöndorff D, Gröne HJ. Bacterial CpG-DNA aggravates immune complex glomerulonephritis: role of TLR9-mediated expression of chemokines and chemokine receptors. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(2):317-26.

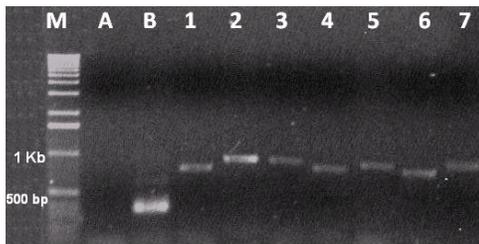
115. Lindell DM, Standiford TJ, Mancuso, Pleshin ZJ, Huffnagle GB. Macrophage inflammatory protein 1alpha/CCL3 is required for clearance of an acute *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection. *Infect Immun* 2001;69(10):6364-9.
116. Ritzman AM, Hughes-Hanks JM, Blaho VA, Wax LE, Mitchell WJ, Brown CR. The chemokine receptor CXCR2 ligand KC (CXCL1) mediates neutrophil recruitment and is critical for development of experimental Lyme arthritis and carditis. *Infect Immun* 2010;78(11):4593-600.
117. Brown CR, Blaho VA, Loiacono CM. Susceptibility to experimental Lyme arthritis correlates with KC and monocyte chemoattractant protein-1 production in joints and requires neutrophil recruitment via CXCR2. *J Immunol* 2003;171(2):893-901.
118. Hung CC, Chang CT, Chen KH, Tian YC, Wu MS, Pan MJ, Vandewalle A, Yang CW. Upregulation of chemokine CXCL1/KC by leptospiral membrane lipoprotein preparation in renal tubule epithelial cells. *Kidney Int* 2006;69(10):1814-1822.
119. Hung CC, Chang CT, Tian YC, Wu MS, Yu CC, Pan MJ, Vandewalle A, Yang CW. Leptospiral membrane proteins stimulate pro-inflammatory chemokines secretion by renal tubule epithelial cells through toll-like receptor 2 and p38 mitogen activated protein kinase. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(4):898-910.
120. Zhang Y, Bao L, Zhu H, Huang B, Zhang H. OmpA-like protein Loa22 from *Leptospira interrogans* serovar Lai is cytotoxic to cultured rat renal cells and promotes inflammatory responses. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2010;42(1):70-79.

121. Proudfoot AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2002;2(2):106–115.
122. Bertolini A, Ottani A, Sandrini M. Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacol Res* 2001;44(6):437–450.

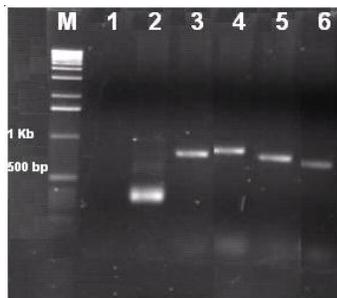
## APÉNDICES



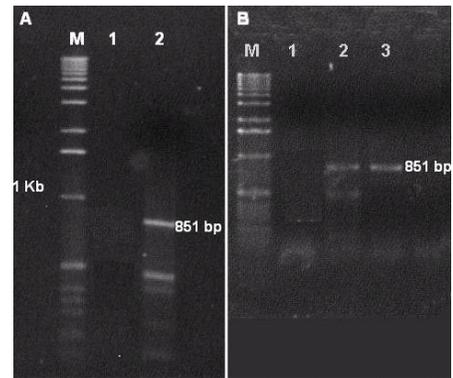
**Figura 1. DNA genómico de ratón y hámster sanos.** M= Marcador de peso molecular 1kb. Izquierda (A). R1 a R5 DNA genómico de oreja de ratón. Derecha (B). H1 a H4 DNA genómico de médula ósea de hámster.



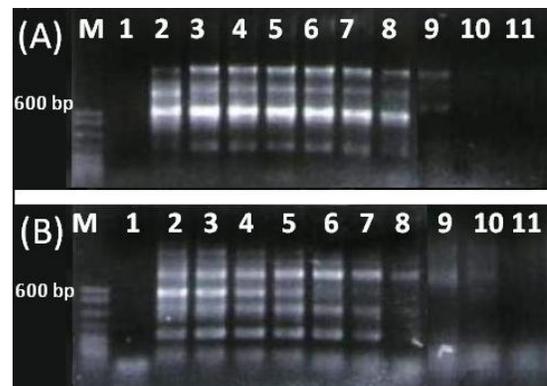
**Figura 2. Amplificación de receptores quimiotácticos por PCR a partir de DNA genómico de ratón sano con iniciadores degenerados.** M= Marcador de peso molecular 1kb. A= control negativo ( $\beta$ -actina). B= control positivo ( $\beta$ -actina). 1= CCR1. 2= CCR2. 3= CCR5. 4= CXCR2. 5= CXCR3. 6= CX3CR1. 7= FPR1.



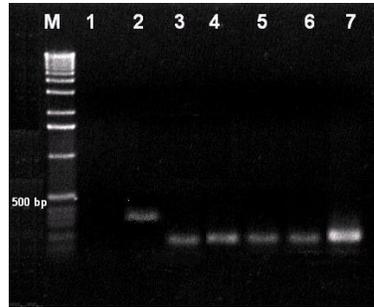
**Figura 3. Amplificación de los receptores quimiotácticos por PCR a partir de DNA genómico de hámster sano (Figura 1[B]).** M= marcador, 1= control negativo ( $\beta$ -actina), 2= control positivo ( $\beta$ -actina), 3= CCR1, 4= CCR5, 5= CXCR2, 6= CX3CR1.



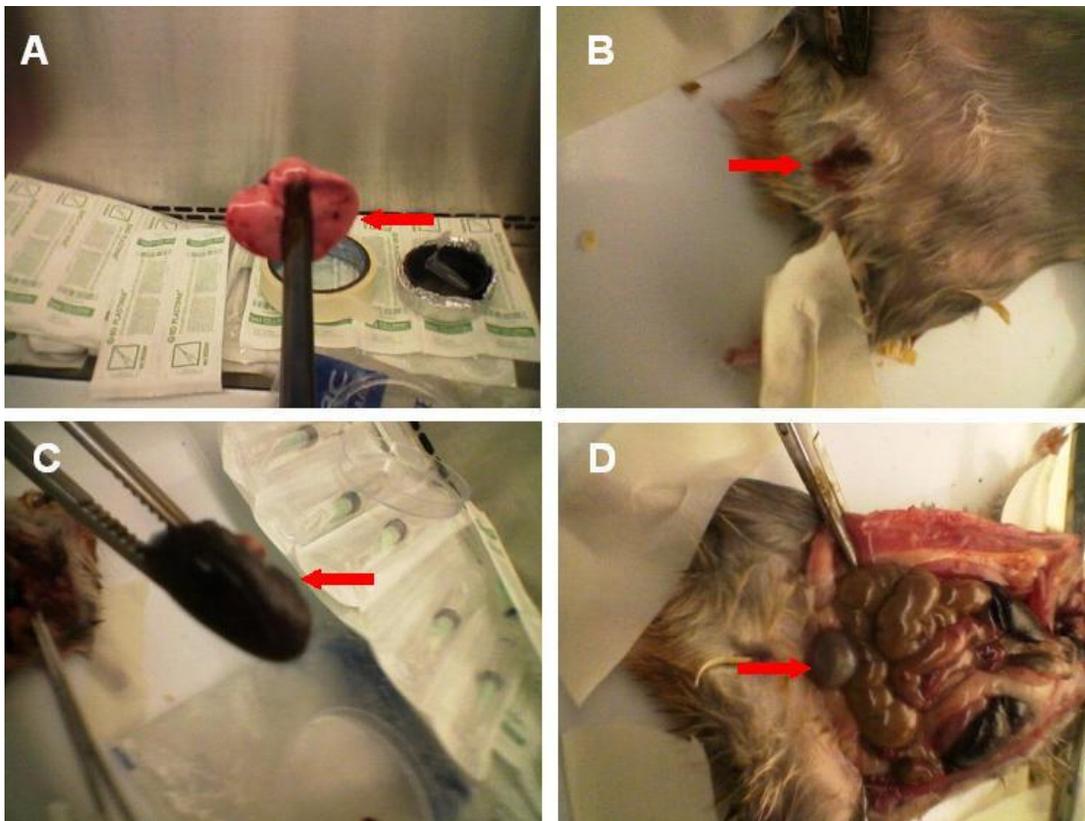
**Figura 4. Amplificación de FPR1 por PCR a partir de DNA genómico de hámster sano.** Izquierda (A) M= Marcador de peso molecular, 1= Control negativo (FPR1), 2= FPR1 con DNA de hámster a una temperatura de 55°C. Derecha (B) M= marcador de peso molecular, 1= Control negativo (FPR1), 2= Control positivo (FPR1 con DNA de hámster a una temperatura de 55°C), 3= FPR1 con DNA de hámster a una temperatura de 57.5°C. Nótese la presencia de bandas diferentes al peso de interés.



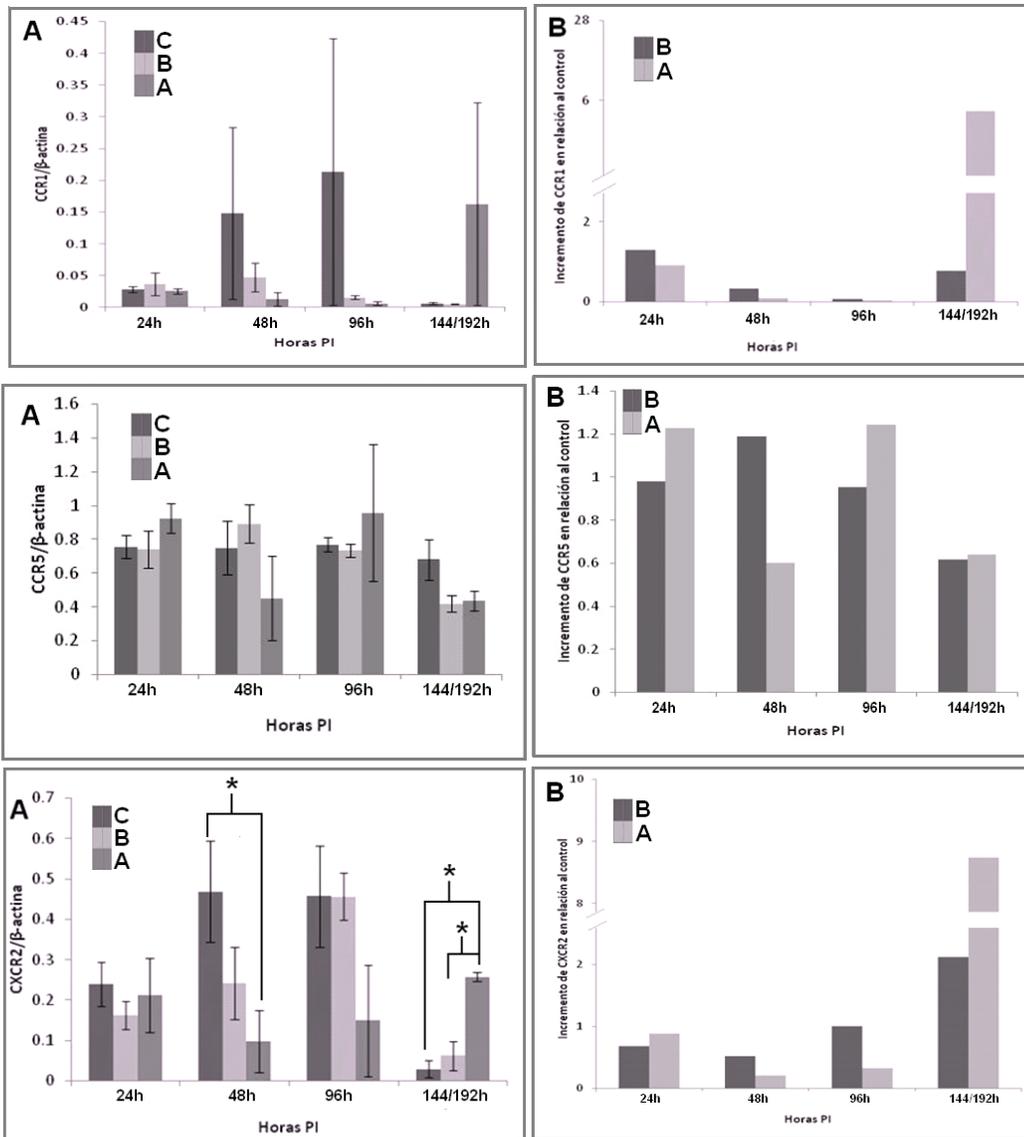
**Figura 5. Amplificación por PCR de CCR2 (A) y CXCR3 (B) con gradientes de temperatura.** M= marcador de peso molecular 600 bp. 1= control negativo para CCR2 (A) o CXCR3 (B). Los números del 2 al 11 corresponden a las temperaturas utilizadas. 2= 55°C. 3=59.1°C. 4= 61.8°C. 5=63.1°C. 6= 64.2°C. 7= 65°C. 8= 65.6°C. 9= 67°C. 10=68.2°C. 11= 70.1°C. Aún con el incremento de temperaturas siguieron persistiendo bandas inespecíficas y se llegó a temperaturas (a partir de los 65.5°C) en las que disminuyó la calidad de replicación.



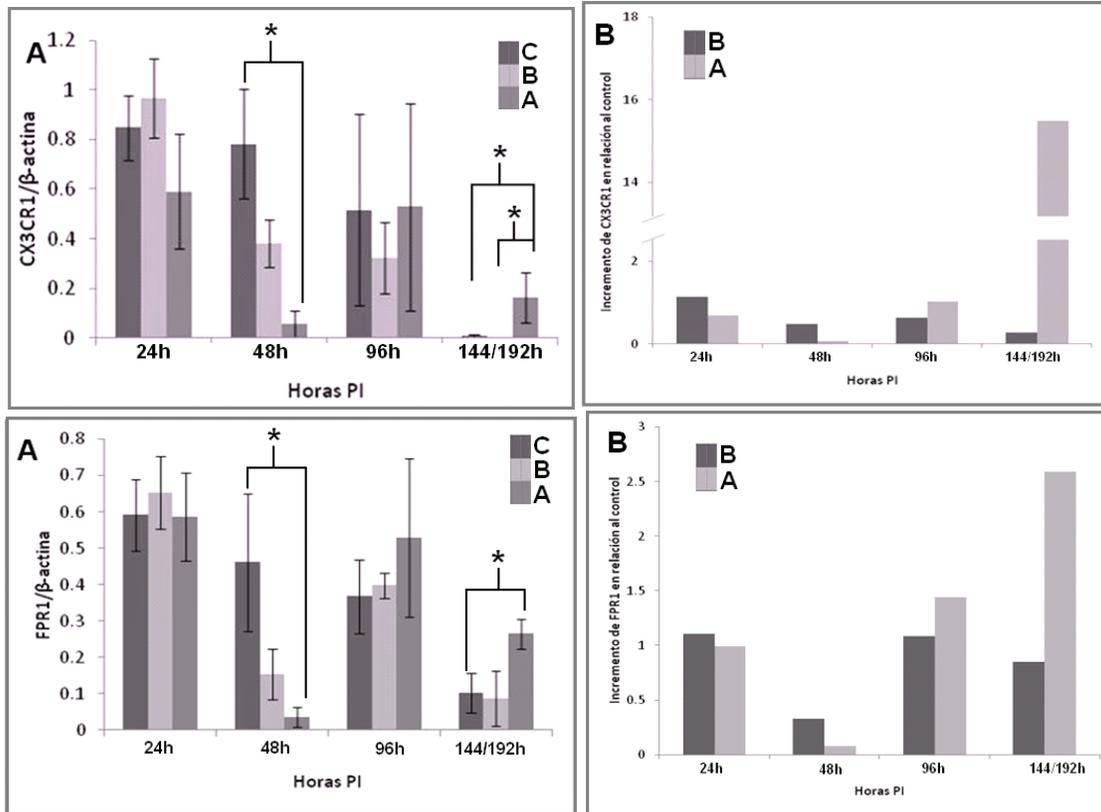
**Figura 6.** Amplificación de los receptores quimiotácticos por PCR a partir de DNA genómico de hámster sano con los iniciadores específicos. M= marcador de peso molecular, 1= control negativo ( $\beta$ -actina), 2= control positivo ( $\beta$ -actina), 3= CCR1, 4= CCR5, 5= CXCR2, 6= CX3CR1, 7= FPR1.



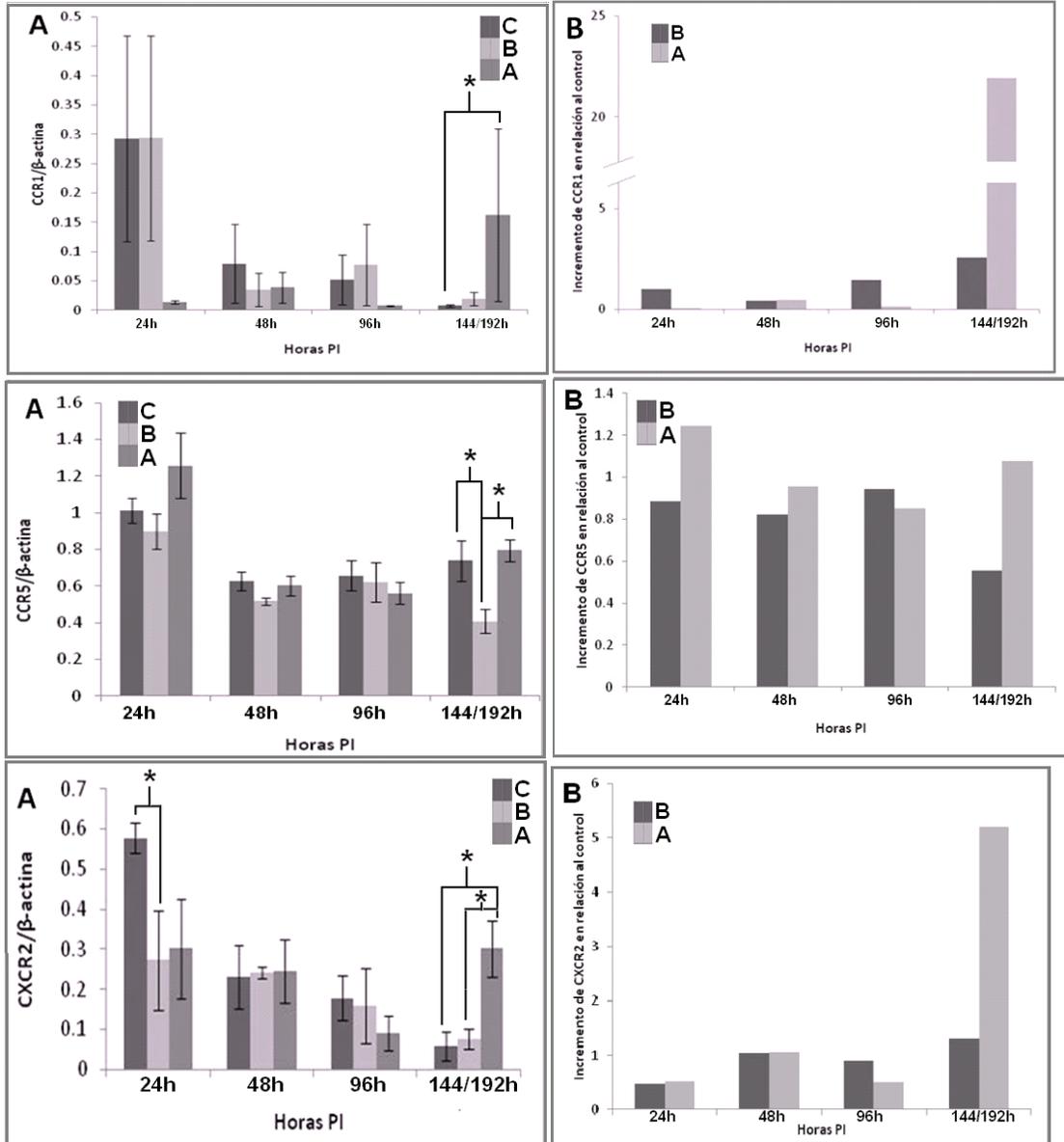
**Figura 7.** Lesiones producidas por la infección con la variante virulenta de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 en hámster. (A). Lóbulo pulmonar con hemorragias petequiales. (B). Evidencia de hemoglobinuria. (C). Riñón completamente congestionado. (D). Vejiga plétora con orina de color rojo debido a la hemoglobinuria.



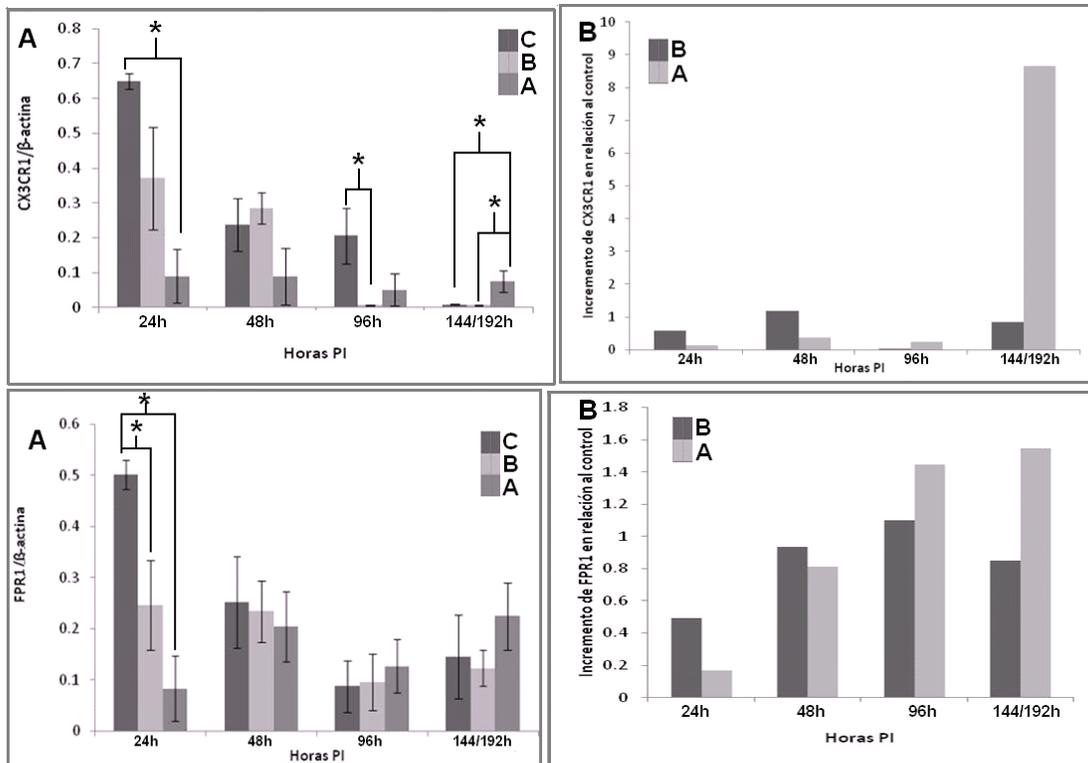
**Figura 8. Transcripción de receptores quimiotácticos inducida por *L. interrogans* serovariedad *Canicola* cepa LOCaS46 a nivel pulmonar.** Izquierda (A). Valores de los receptores quimiotácticos normalizados con  $\beta$ -actina durante los cuatro muestreos. C= hámsteres no infectados; B= hámsteres infectados con la variante no virulenta de *Leptospira*; A= hámsteres infectados con la variante virulenta de *Leptospira*. Derecha (B). Incremento en la transcripción de los receptores quimiotácticos en relación al grupo testigo durante los cuatro muestreos. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar en la medición de la densidad óptica. (\* $P \leq 0.05$ ) determinada mediante la prueba de Kluskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney.



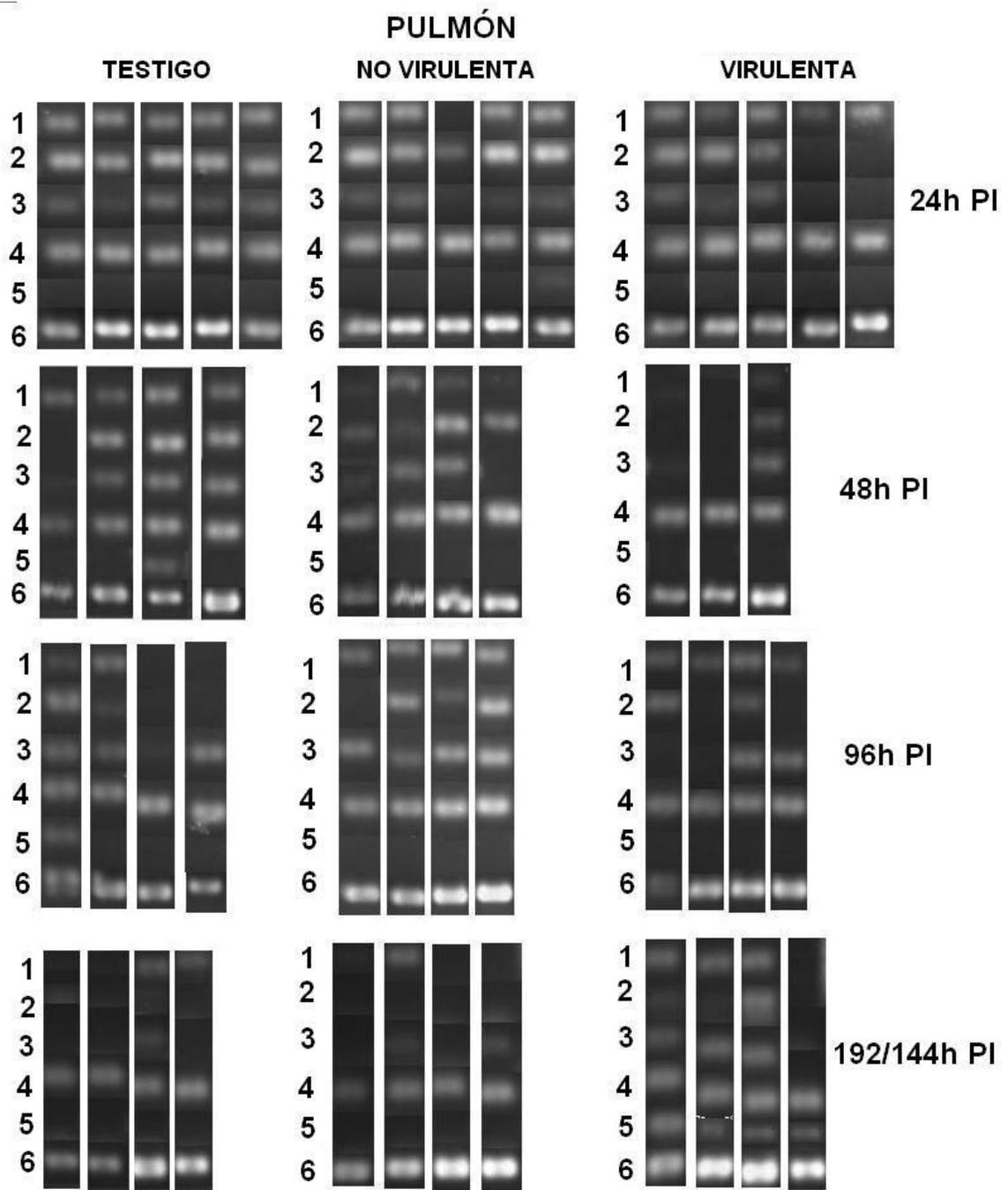
**Figura 8 (continuación). Transcripción de receptores quimiotácticos inducida por *L. interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 a nivel pulmonar.** Izquierda (A). Valores de los receptores quimiotácticos normalizados con  $\beta$ -actina durante los cuatro muestreos. C= hámsteres no infectados; B= hámsteres infectados con la variante no virulenta de *Leptospira*; A= hámsteres infectados con la variante virulenta de *Leptospira*. Derecha (B). Incremento en la transcripción de los receptores quimiotácticos en relación al grupo testigo durante los cuatro muestreos. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar en la medición de la densidad óptica. (\* $P \leq 0.05$ ) determinada mediante la prueba de Kluskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney.



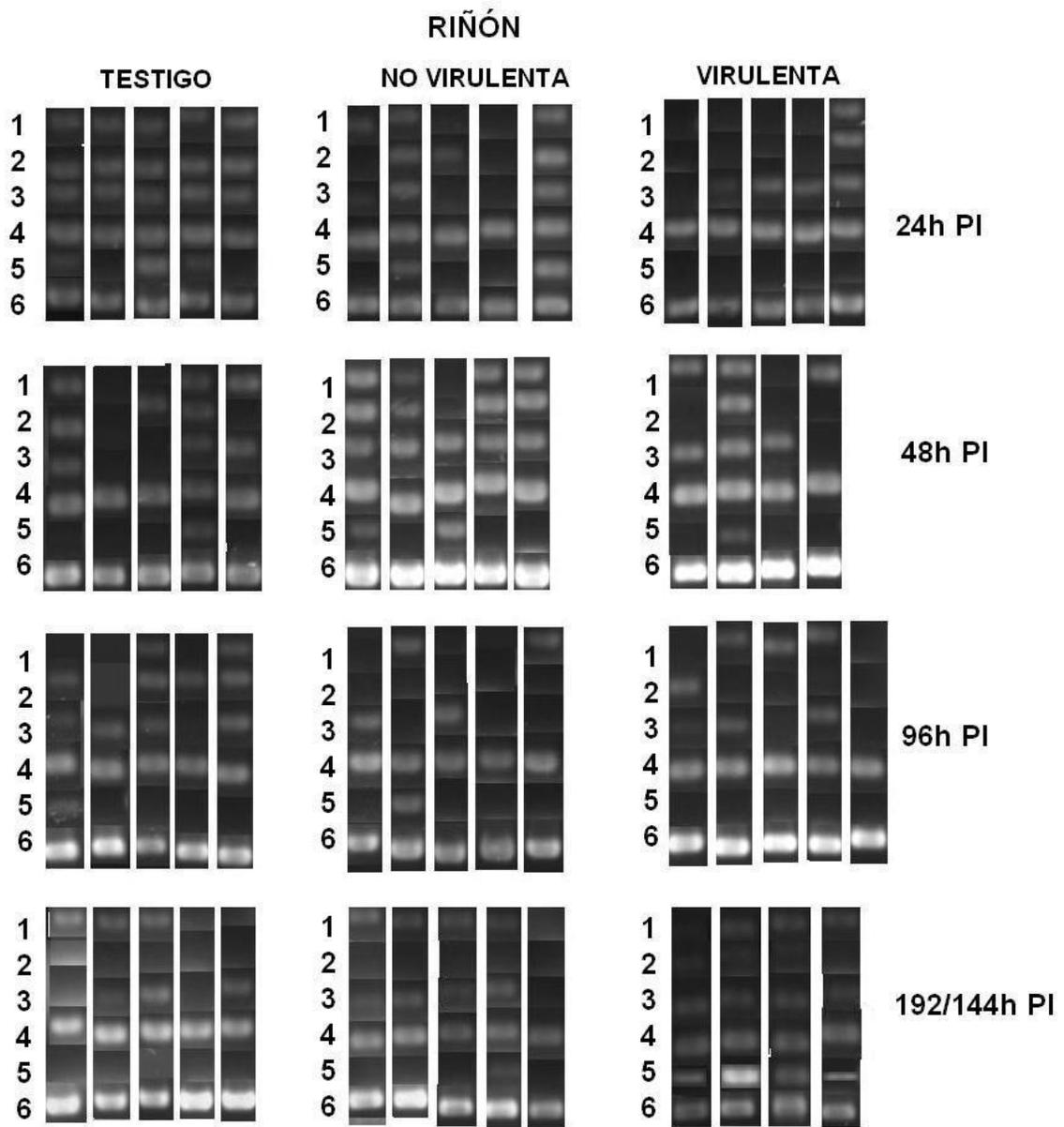
**Figura 9. Transcripción de receptores quimiotácticos inducida por *L. interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 a nivel renal.** Izquierda (A). Valores de los receptores quimiotácticos normalizados con  $\beta$ -actina durante los cuatro muestreos. C= hámsteres no infectados; B= hámsteres infectados con la variante no virulenta de *Leptospira*; A= hámsteres infectados con la variante virulenta de *Leptospira*. Derecha (B). Incremento en la transcripción de los receptores quimiotácticos en relación al grupo testigo durante los cuatro muestreos. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar en la medición de la densidad óptica. (\* $P \leq 0.05$ ) determinada mediante la prueba de Kluskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney.



**Figura 9 (continuación). Transcripción de receptores quimiotácticos inducida por *L. interrogans* serovariedad *Canicola* cepa *LOCaS46* a nivel renal.** Izquierda (A). Valores de los receptores quimiotácticos normalizados con  $\beta$ -actina durante los cuatro muestreos. C= hámsteres no infectados; B= hámsteres infectados con la variante no virulenta de *Leptospira*; A= hámsteres infectados con la variante virulenta de *Leptospira*. Derecha (B). Incremento en la transcripción de los receptores quimiotácticos en relación al grupo testigo durante los cuatro muestreos. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar en la medición de la densidad óptica. (\* $P \leq 0.05$ ) determinada mediante la prueba de Kluskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney.



**Figura 10. Electroforesis de los productos de amplificación de receptores quimiotácticos y  $\beta$ -actina por RT-PCR de pulmón.** Geles de agarosa al 2% teñidos con solución de bromuro de etidio al 1%. 1= FPR1. 2= CX3CR1. 3= CXCR2. 4= CCR5. 5= CCR1. 6= $\beta$ -actina.



**Figura 11. Electroforesis de los productos de amplificación de receptores quimiotácticos y  $\beta$ -actina por RT-PCR de riñón.** Geles de agarosa al 2% teñidos con solución de bromuro de etidio al 1%. 1= FPR1. 2= CX3CR1. 3= CXCR2. 4= CCR5. 5= CCR1. 6= $\beta$ -actina.

INICIADOR	SECUENCIA	LONGITUD ESPERADA
CCR1 Fw	CYYTVGTGT TYR TCATTG GMSTGG	768bp
CCR1 Rv	GRT TGA CAC AAC AGT GGG TGT AG	
CCR2 Fw	TTC ATC CAY GGC ATA CTA TCA ACA T	895 bp
CCR2 Rv	TTC CAA GAGTCT CTGTCA CCT GC	
CCR5 Fw	TAT RGT ATGTCA GCA CCCTGC CAA	901 bp
CCR5 Rv	TTC GGA AGA ACA CWG AGA GAT AAYT	
CXCR2 Fw	TAT GCT GTG GTT GTM ATATAC GTY C	776 bp
CXCR2 Rv	CTGTGG AGG AAG CCA AGA ATCTC	
CXCR3 Fw	GTG GCT GCT GTG CTA CTG AGY C	847bp
CXCR3 Rv	ATG ATT CTCTCC GTG AAG ATG AMG	
CX3CR1 Fw	TTGAGT ATGAYG AYT CTG CTG AGG	752 bp
CX3CR1 Rv	GAA GAA GTT GTA GAA YTT GAG AGT C	
FPR1 Fw	CRC ACK GTC ACC ACC ATCTC	851 bp
FPR1 Rv	TIG GIK CCTGTR TCA CTG GTY	

**Cuadro 1. Secuencias de los iniciadores degenerados de receptores quimiotácticos basados los genes de rata, ratón y conejo.**

Fw= iniciador en sentido. Rv= iniciador en antisentido

INICIADOR	SECUENCIA	LONGITUD ESPERADA
SHCCR1 Fw	CAT CAT CAC CAG CAT CAT AAC CTG	170 bp
SHCCR1 Rv	CAA GGA GGT TCA TTGTTA GTG CCT G	
SHCCR5 Fw	TTC TTGCTC ACT CTC CCA GTC TG	163 bp
SHCCR5 Rv	CAT GGA CAA TAG CCA AGT ACCTAT C	
SHCXCR2 Fw	TGA TGT CTA CCT GCT GAA TCT AGC	161 bp
SHCXCR2 Rv	GTA GCA AGA CACTACTGT AGA AGG	
SHCX3CR1 Fw	ATC ACC GAC ATCTAC CTC CTG AAC	179 bp
SHCX3CR1 Rv	CTG ATGACG GTA ATG AAG AAT ATG C	
SHFPR1 Fw	GGC TCA GAA CCA CAG AAC CGT G	190 bp
SHFPR1 Rv	CAC CTT CTT CTT CTC TAC AGG ATC	
$\beta$ -actina Fw	ACC AACTGG GAC GAT ATG GAG	353 bp
$\beta$ -actina Rv	GTC AGG ATC TIC ATG AGG TAG TC	

**Cuadro 2. Secuencias de los iniciadores específicos de receptores quimiotácticos del hámster.**

Fw= iniciador en sentido. Rv= iniciador en antisentido.

Muestreo	Testigo n = 20	No virulenta n = 20	Virulenta n = 20
24 h	5	5	5
48 h	5	5	5
96 h	5	5	5
192 h	5	5	5*

**Cuadro 3. Diseño experimental de infecciones con *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola cepa LOCaS46 virulenta y no virulenta ( $1 \times 10^3$ ). Testigo fueron inoculados con 1 ml de medio EMJH estéril. n = Número de animales.\* 4 de los 5 animales del Grupo virulento murieron al 6° día, se sacrificó ese mismo día al hámster que no murió.**

<i>Mesocricetus auratus</i>	Longitud	Porcentaje de homología en la secuencia de nucleótidos (nt)		
Receptor- núm. acceso GeneBank-		<i>Cricetulus griseus</i> núm acceso-%	<i>Rattus norvegicus</i> núm acceso-%	<i>Mus musculus</i> núm acceso-%
CCR1 (JQ013100.1)	402 bp	XM_003507728.1 95%	NM_020542.2 82%	NM_009912.4 80%
CCR5 (JQ013101.1)	566 bp	XM_003507731.1 94%	NM_053960.3 92%	NM_009917.5 94%
CXCR2 (JQ013102.1)	728 bp	XM_003515565.1 95%	NM_017183.1 84%	NM_009909.3 87%
CX3CR1 (JQ013103.1)	635 bp	XM_003505931.1 93%	NM_133534.1 89%	NM_009987.3 90%
FPR1 (JQ013104.1)	791 bp	XM_003514632.1 93%	NM_001106216.1 85%	NM_013521.2 87%

**Cuadro 4 Homología de las secuencias de los receptores quimiotácticos de *Mesocricetus auratus* con respecto a sus genes parálogos en hámster chino, rata y ratón.**  
núm= número. bp=pares de base.

Muestreo	Hígado			Pulmón			Riñón			Total**	
	Horas	PI		C	B	A	C	B	A	B	A
24	0/5	2/5	4/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	40%	80%
48	0/5	4/5	4/5 <sup>a</sup>	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	2/5 <sup>a</sup>	80%	100%
96	0/5	1/5 <sup>a</sup>	1/5	0/5	1/5	4/5	0/5	1/5 <sup>a</sup>	5/5	40%	100%
144/192	0/5	0/5	5/5*	0/5	1/5 <sup>a</sup>	4/5*	0/5	2/5 <sup>a</sup>	5/5*	60%	100%

**Cuadro 5. Resultados del aislamiento de *Leptospira* en medio Fletcher.** C= no infectado, B= no virulenta, A= virulenta. PI= post infección. \*Murieron 4 de 5<sup>a</sup> las 144 h, se sacrificó al último. \*\*Porcentaje en relación a los aislados obtenidos a partir de órganos provenientes de diferentes animales en ese mismo muestreo. <sup>a</sup>= por lo menos uno de esos animales son diferentes. No se aisló ni se observó la presencia de la bacteria en los animales no infectados.