
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME FINAL DEL PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL
POR INVESTIGACIÓN

**Identificación de *Leptospira interrogans* serovariedad
Canicola en tejidos del Modelo Animal *Mesocricetus auratus*
en condiciones de inmunocompetencia**

QUE PRESENTA LA ALUMNA

Assereth Hernández Delgado

2203057374

ASESORES

Dra. Patricia Castilla Hernández

Núm. Económico: 30606

Laboratorio de Biotecnología Ambiental

Depto. El Hombre y su Ambiente

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

M en C. Erika Margarita Carrillo Casas

Ced. Prof.: 4556989

Investigadora en Ciencias Médicas

Depto. Biología Molecular e Histocompatibilidad

Subdirección de Enseñanza e Investigación

Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de importancia en salud pública debido a su amplia distribución y a la posibilidad de presentarse en su forma severa conocida como enfermedad de Weil en el hombre, caracterizada por daño multisistémico que puede afectar al hígado, pulmones, corazón y, mayormente, a los riñones. La bacteria *Leptospira interrogans*, es la principal responsable de los casos de infección en humanos debido a su alta virulencia y se clasifica en más de 350 serovariedades, entre las cuales la serovariedad Canicola destaca por su relevancia epidemiológica. En México, la leptospirosis se presenta durante todo el año, con un incremento en la época de lluvias; sin embargo, su diagnóstico puede verse limitado por el subregistro y similitud clínica con otras enfermedades como dengue, hepatitis, fiebre tifoidea, covid-19, entre otras. En este contexto, el uso de modelos animales como el hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) capaz de desarrollar la sintomatología de leptospirosis similar a la que desarrollan los seres humanos, resulta fundamental para comprender la dinámica de la infección y la respuesta inmune.

El objetivo del presente estudio fue identificar la presencia de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola en tejidos del Modelo Animal hámster (*Mesocricetus auratus*) en condiciones de inmunocompetencia mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final. Se evaluaron dos grupos de hámsteres: un grupo inoculado a diferentes días post infección y un grupo control no inoculado. De cada animal, se recolectaron muestras de distintos órganos incluyendo hígado, bazo, riñón, pulmón, cerebro, corazón y ojo. El ácido desoxirribonucleico (ADN) se obtuvo mediante un método de extracción orgánica y su integridad y pureza se evaluó por espectrofotometría considerando las relaciones de absorbancia A260/280 y A260/230.

La detección por PCR permitió identificar la presencia de ADN del género *Leptospira* en algunos tejidos de hámsteres evaluados. Estos resultados sugieren una dinámica temporal de la infección en hámsteres inmunocompetentes, posiblemente relacionada con la competencia de la respuesta inmune del hospedero y la disminución de la carga bacteriana conforme avanza el curso de la enfermedad.

Palabras clave: ADN, *Mesocricetus auratus*, leptospirosis, PCR, inmunocompetencia.

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial con mayor incidencia en zonas tropicales y subtropicales. La enfermedad en humanos produce síntomas como fiebre, mialgia, escalofríos y cefalea. Además, puede presentarse como forma anictérica o de forma ictérica, conocida como enfermedad de Weil que se caracteriza por el aumento de bilirrubina sérica (Nagraik *et al.*, 2020). En sus casos más severos puede derivar en insuficiencia renal, afectación hepática, cardíaca y pulmonar, e incluso la muerte (Chacko *et al.*, 2021).

Una vez que la bacteria atraviesa la piel lesionada o la mucosa lacerada, da comienzo a la fase leptospirémica de la enfermedad. En esta etapa, la bacteria ingresa al torrente sanguíneo donde se multiplica y disemina rápidamente durante los primeros días de la infección, proceso que se ve favorecido por la presencia de enzimas asociadas a la membrana bacteriana. Así mismo, la invasión de diversos órganos está relacionada con la alta movilidad de la bacteria debido a la presencia de flagelos y su capacidad para atravesar tejidos (Figura 1).

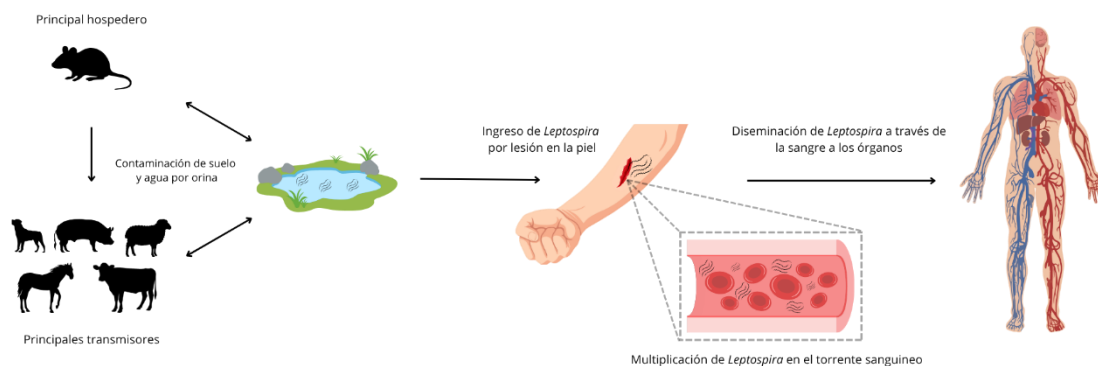


Figura 1. Esquema del proceso de infección de leptospirosis. Elaboración propia con elementos de Canva.

Posteriormente, en condiciones de inmunocompetencia, se activa la respuesta inmune innata que comienza con el reconocimiento de los antígenos bacterianos por parte del sistema inmunitario, desencadenando una respuesta inflamatoria sistémica al iniciar la producción de anticuerpos IgM y las bacterias comienzan a ser eliminadas mediante fagocitosis. Finalmente, se establece la respuesta inmune adaptativa, caracterizada por el aumento progresivo de anticuerpos IgG que contribuyen a la eliminación de la bacteria del torrente sanguíneo y diversos tejidos. En esta etapa, se inicia la fase leptospirúrica, en la cual la bacteria coloniza los túbulos renales y es eliminada a través de la orina (Aranzazu *et al.*, 2020; Abgueguen, 2014; Gallegos-Mesén y Leandro-Sandi, 2010).

Esta enfermedad es causada por bacterias del género *Leptospira*, caracterizadas por su forma helicoidal con extremos en forma de gancho. Estas bacterias pertenecen al Dominio Bacteria, filo Spirochaetes, orden Spirochaetales, familia Leptospiraceae y género *Leptospira* (Nagraik *et al.*, 2020). Las especies de *Leptospira* se clasifican en subclados: S1 y S2, P1 y P2; el subclado P1 contiene especies patógenas de alta virulencia. La especie *Leptospira interrogans* (Figura 2) es la principal causante de infecciones en humanos (Haake y Matsunaga, 2021; Giraud-Gatineau *et al.*, 2024), presenta una membrana externa rica en proteínas y lipopolisacáridos, estos últimos actúan como principales antígenos que permiten su clasificación en más de 350 serovariedades (Arent *et al.*, 2022; Vernel-Pauillac *et al.*, 2021).

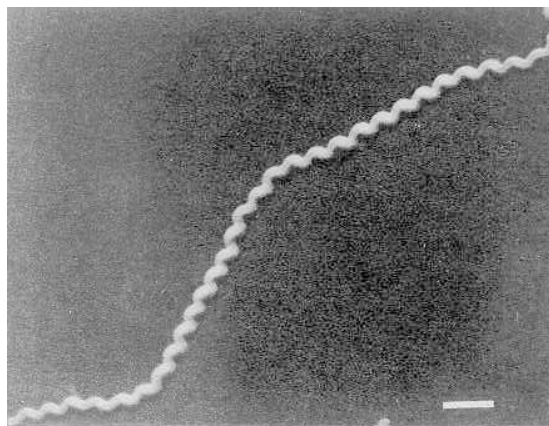


Figura 2. Micrografía de *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. Tomado de Medical Microbiology, por S. Baron (ed.), vía National Center of Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8451/>

L. interrogans apareció aproximadamente hace 53.7 millones de años, durante el Paleógeno, lo que coincidió con la evolución de mamíferos susceptibles y condiciones óptimas para su desarrollo (Kurilung *et al.*, 2019). Los roedores son los principales transmisores a otros hospederos (Levett, 2001) como caninos, bovinos, equinos, porcinos u ovejas que pueden transmitir la infección al ser humano mediante contacto directo o indirecto con fluidos corporales, tejidos o cuerpos de agua contaminados con orina (Torres-Castro *et al.*, 2016; Nagraik *et al.*, 2020).

En México, la leptospirosis se reporta todo el año con incremento durante la época de lluvias. Los estados con mayor prevalencia son Sinaloa, Veracruz y Tabasco (Yescas-Benítez *et al.*, 2020). Los caninos, al estar en estrecho contacto con los humanos, han sido ampliamente estudiados, en ellos la serovariedad Canicola es predominante en 5 estados

de la república con una seroprevalencia del 14 % a 88.5 % (Andrade-Silveira *et al.*, 2024; Jasso-Obregón *et al.*, 2024).

Para el estudio de enfermedades zoonóticas se emplean modelos animales como ratones y hámsteres (Gomes-Solecki *et al.*, 2017). El hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) (Figura 3) fue introducido como modelo animal en 1930 por el zoólogo Israel Aharoni en el estudio de la enfermedad Leishmaniasis Visceral (Adler, 1948). Se ha visto que el hámster sirio dorado desarrolla complicaciones hepáticas, renales, y sintomatología característica de la forma aguda de la enfermedad, por lo que es un modelo adecuado para este tipo de estudio (Valentine *et al.*, 2012).



Figura 3. Hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*). Fotografía de Joselyn José (2025), utilizada con permiso.

Este estudio cualitativo tiene como propósito identificar la presencia de *L. interrogans* serovariedad Canicola en tejidos de los órganos de hámsteres sirios inmunocompetentes y se espera observar baja presencia bacteriana tisular asociada a daño tisular limitado tras la activación de la respuesta inmunitaria competente.

Planteamiento del problema y justificación

Actualmente, existe conocimiento limitado sobre los factores de virulencia de *Leptospira* y su interacción con el sistema inmunitario de los hospederos. Dado que la leptospirosis es una enfermedad potencialmente mortal, los estudios en modelos animales son fundamentales para caracterizar su fisiopatología a nivel molecular, la respuesta inmunitaria a la infección, entre otros aspectos. La información obtenida en este tipo de investigaciones es valiosa, ya que contribuye al desarrollo y mejoramiento de vacunas, así como a la optimización de tratamientos (Cagliero *et al.*, 2020).

En México, en temporada de lluvias se observa un ligero aumento en los casos de leptospirosis. Sin embargo, existe un subregistro debido a que puede confundirse con

enfermedades de sintomatología similar como dengue, hepatitis viral, neumonía, meningitis aséptica, brucelosis, fiebre tifoidea, covid-19, entre otras. Además del escaso acceso a pruebas diagnósticas y la falta de capacidad de laboratorios clínicos para detectarla (Yescas-Benítez *et al.*, 2020; Giraud-Gatineau *et al.*, 2024). De acuerdo con información del boletín de epidemiología del SINAVE, en lo que va del 2025 hasta finales del mes de mayo, se han reportado 154 casos de los cuales 55 pertenecen al estado Veracruz (Secretaría de salud, 2025).

En este contexto, el presente trabajo que se enfoca en la identificación de *L. interrogans* serovariedad Canicola, la más prevalente en México, utilizando al hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) como Modelo Animal, ampliamente empleado por su alta susceptibilidad a la infección, busca aportar conclusiones sobre la presencia de la enfermedad en los diferentes tejidos del hámster a diferentes días después de la infección con el fin de ser base de estudios complementarios, esenciales para el estudio y entendimiento de la enfermedad para el desarrollo de estrategias de control y prevención, lo cual se traduce en un impacto positivo en la salud pública al permitir abordar la enfermedad de manera más oportuna.

Antecedentes

Al ser una enfermedad que se distribuye en todo el mundo y potencialmente letal para los humanos, se han realizado variedad de estudios de leptospirosis en hámsteres (Coutinho *et al.*, 2014; Maruoka *et al.*, 2021; Inamasu *et al.*, 2022; Mukherjee *et al.*, 2022). Algunos de estos estudios, se han enfocado en el efecto de la enfermedad en los distintos órganos como el de Coutinho *et al.*, en 2014 donde se describe la cinética de la enfermedad y la infección en hámsteres inoculados vía subcutánea e intradérmica de *L. interrogans* serovariedad Copenhageni. Encontraron cambios histopatológicos en el riñón y su periferia, cambios inflamatorios intersticiales que llevaron al deterioro de la función renal, pérdida de peso, y disfunción hepática. Realizaron PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa para analizar la carga de la infección, siendo mayor en el riñón y, en comparación con la vía subcutánea, la vía intradérmica resultó en una menor carga de infección en los órganos.

Maruoka *et al.*, en 2021 también investigaron la dinámica de *Leptospira*, los cambios histopatológicos en el riñón y el grado de disfunción renal en las fases aguda y crónica de la leptospirosis en el modelo animal hámster. Infectaron 68 hámsteres subcutáneamente

con *L. interrogans* serovariedad Manilae, de los cuales 53 desarrollaron leptospirosis aguda mortal, y 15 se recuperaron de la fase aguda; 13 de ellos mostraron colonización renal por *Leptospira* en la fase crónica y 5 asintomáticos también presentaron colonización renal en la fase crónica. Llevaron a cabo la tinción de inmunofluorescencia, la cual mostró la distribución de *Leptospira* en el intersticio renal en la fase aguda temprana y luego se propagaron al intersticio circundante. Los riñones de los hámsteres supervivientes en la fase crónica mostraron lesiones atróficas irregulares de los túbulos, es decir que la distribución renal de *Leptospira* durante la fase aguda probablemente influye en el grado de atrofia tubular y se refleja en enfermedad renal crónica.

Inamasu *et al.*, en 2022 realizaron un estudio donde investigaron los cambios patológicos, la distribución de *Leptospira* en la pared intestinal, así como su presencia en el contenido intestinal y las heces de hámsteres infectados por vía subcutánea con *L. interrogans*. Como resultado, observaron enrojecimiento macroscópico en el yeyuno y el íleon, hemorragia submucosa y no observaron neutrófilos ni cambios evidentes en el colon. Además, aislaron *Leptospira* de todas las paredes intestinales, lo que sugiere que la invasión de la bacteria en la pared intestinal y la hemorragia submucosa asociada podrían ser la causa de los síntomas gastrointestinales que se presentan en la leptospirosis, también sugieren que además de la orina, las heces podrían ser una fuente de infección.

Finalmente, Nikaido *et al.*, en 2019 realizaron un estudio sobre la invasión transbronquial y proliferación de *L. interrogans* en los pulmones del hámster. Inyectaron *Leptospira* en las tráqueas de los hámsteres y observaron por primera vez que la espiroqueta es capaz de infectar a través del tracto respiratorio. También realizaron cultivos, observación macroscópica y análisis histopatológico. Sus resultados sugieren que *Leptospira* invade el tejido pulmonar, prolifera en el estroma rico en colágeno adyacente a los bronquios y vasos sanguíneos, para después extenderse por todo el cuerpo a través del torrente sanguíneo. En el pulmón, las bacterias se infiltraron en la pared alveolar, se propagaron en él y finalmente, causaron hemorragia pulmonar. Concluyeron que el tracto respiratorio puede ser una puerta de entrada para *Leptospira* por inhalación.

OBJETIVO GENERAL

Identificar la presencia de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola en tejidos del Modelo Animal hámster (*Mesocricetus auratus*) en condiciones de inmunocompetencia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los tejidos del Modelo Animal hámster (*Mesocricetus auratus*) infectados con *L. interrogans* en condiciones de inmunocompetencia.
- Obtener ADN (ácido desoxirribonucleico) de las muestras de tejido por extracción de lisis alcalina.
- Determinar la presencia de *L. interrogans* serovariedad Canicola en tejidos de hámster (*Mesocricetus auratus*) en condición de inmunocompetencia mediante la PCR.
- Analizar el impacto del estado inmunológico de inmunocompetencia sobre la infección de *L. interrogans* en tejidos de hámster (*Mesocricetus auratus*).

METODOLOGÍA

Métodos utilizados para el desarrollo del presente estudio.

Extracción de ADN por el método fenol-cloroformo-proteinasa K

Es un método orgánico ampliamente utilizado para la extracción de ADN (Sambrook, 2001). El principio de este método consiste en separar el ADN de los componentes celulares por medio de lisis celular y la solubilidad diferencial en solventes orgánicos; la lisis celular y la digestión de las proteínas se realiza con el tensioactivo SDS (Dodecil Sulfato de Sodio), la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para inhibir la acción de las DNAsas y la digestión por proteinasa K. Después, para separar el ADN se utiliza fenol y cloroformo que son solventes orgánicos para desnaturalizar las proteínas, al cloroformo debe añadirse alcohol isoamílico para facilitar la separación de las fases acuosas y orgánicas. Finalmente, con etanol se modifica la estructura conformacional tridimensional del ADN de manera reversible y controlada que permite su purificación por precipitación (Oda *et al.*, 2016).

Amplificación de ADN por PCR

La técnica de PCR fue desarrollada por Kary Mullis en 1983 y es de las herramientas más utilizadas para el estudio genético y molecular por su alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia con resultados confiables y fáciles de analizar (Tamay de Dios, 2013). El principio de esta técnica se basa en la reacción enzimática de la enzima ADN polimerasa que duplica una secuencia de ADN específica. Se realiza en un tubo de ensayo donde se agrega la muestra de ADN, ADN polimerasa, iniciadores que delimitan la región que se va a amplificar,

desoxirribonucleótidos (dNTP's) como sustrato para la síntesis de las copias y solución de amortiguador (Burbano *et al.*, 2017).

Electroforesis en gel de agarosa con Bromuro de Etidio

El método de electroforesis en geles de agarosa fue desarrollado por Vin Thorne en la década de 1960. Esta técnica se utiliza para separar fragmentos de ADN en función de su tamaño y conformación. El principio se basa en la carga negativa que posee el ADN debido a sus grupos fosfato; al aplicar un campo eléctrico, las moléculas de ADN migran hacia el electrodo positivo. El gel de agarosa actúa como una matriz porosa tridimensional formada por una red de canales que funciona como un tamiz molecular, permitiendo que las moléculas más pequeñas se desplacen más rápidamente a través de los poros, mientras que las más grandes experimentan mayor resistencia y migran más lentamente. Finalmente, los fragmentos separados pueden visualizarse mediante tinción con bromuro de Etidio (EtBr) ya que se intercala entre las bases del ADN, interactúa por fuerzas de Van der Waals y emite fluorescencia al exponerse a luz ultravioleta (Sambrook, 2001).

ACTIVIDADES REALIZADAS

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de investigación de Biología Molecular e Histocompatibilidad del Hospital General "Dr. Manuel Gea González". Se dividió en dos etapas: la primera consistió en la extracción de ADN a partir de tejidos de hámster, y la segunda en la aplicación de la PCR para la identificación de *L. interrogans* serovariedad Canicola.

Se evaluaron dos grupos de hámsteres: el primero correspondiente a animales inoculados con *L. interrogans* serovariedad Canicola, sacrificados a diferentes días post infección, y el segundo correspondiente a un grupo no inoculado. De cada animal se recolectaron muestras de hígado, bazo, riñón, pulmón, cerebro, corazón y ojo con el fin de evaluar la presencia o ausencia de ADN de *Leptospira* en cada uno de estos órganos.

Extracción de ADN de tejido de hámster

Se realizó la extracción de ADN a partir de pequeñas muestras de tejido de siete órganos por cada hámster (hígado, bazo, riñón, pulmón, cerebro, corazón y ojo).

El procedimiento de aislamiento de ADN consistió en transferir las muestras de tejido a tubos para microcentrífuga de 1.5 ml para su maceración con pistilos de plástico estéril. Posteriormente, a cada muestra se le añadieron 1.06 ml de solución SNET y proteinasa K (Anexo 1). Las muestras se incubaron durante toda la noche en baño maría a 56 °C. Los materiales empleados durante esta etapa se describen en el Anexo 2.

Posteriormente, se transfirieron las muestras lisadas a nuevos tubos de 2 ml para microcentrífuga. Se añadieron 800 µl de fenol equilibrado y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min. La fase acuosa se transfirió a nuevos tubos de 2 ml, se agregaron 800 µl de fenol-cloroformo (25:24) y se centrifugaron nuevamente a 10,000 rpm durante 10 min. Posteriormente, la fase acuosa se transfirió a tubos de 2 ml, se añadieron 800 µl de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1), se centrifugó y se recuperó nuevamente la fase acuosa en tubos de 1.5 ml. Finalmente, se agregaron 70 µl de acetato de sodio 3M y 1 ml de etanol frío grado molecular a cada muestra, y se dejaron precipitar durante toda la noche a -70°C.

Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 min a 4°C para favorecer la formación del pellet de ADN, y se retiró el etanol. El pellet se lavó con 1 ml de etanol al 75 %, se centrifugó nuevamente a máxima velocidad durante 15 min a 4°C y se retiró el sobrenadante. Estos pasos se repitieron dos veces más. A continuación, los pellets se dejaron secar a 80 °C entre 40 a 60 min. Finalmente, el ADN se suspendió en 50 µl de solución TE (Anexo 1) a 65° C y las muestras se conservaron a 4°C para su uso posterior.

Cuantificación por espectrofotometría y dilución de las muestras de ADN

La cuantificación del ADN se realizó en el equipo NanoDrop One^c de la marca Thermo Scientific (Figura 4). El blanco se calibró con 2 µl de solución TE y la medición de las muestras se llevó a cabo en volumen de 1 µl de cada una. Los resultados se expresaron como concentración de ADN en nanogramos por microlitro (ng/µl) y se registraron en una base de datos. Con base en las concentraciones obtenidas, se realizaron los cálculos necesarios para preparar diluciones con un volumen final de 50 µl a una concentración ≤100 ng/µl para cada muestra.



Figura 4. Equipo NanoDrop One^C. Fotografía de Miroslava Candelario (2025), utilizada con permiso.

*Amplificación de ADN de *L. interrogans* por PCR*

El procedimiento se realizó de acuerdo con el protocolo especificado para la enzima recombinante GoTaq® ADN polimerasa (PROMEGA), de acuerdo con lo reportado por Cai *et al.*, en el año 2010.

Dentro de una campana con luz UV, se preparó la mezcla para la PCR (Anexo 3 y 4) en un tubo estéril de microcentrífuga de 600 µl. La cantidad de mezcla se calculó para diecisiete muestras (reacciones), tres controles: positivo, negativo y NTC (Control sin ADN molde) y catorce muestras de los órganos de dos hámsteres, las cuales se colocaron en tubos para PCR de 200 µl.

Las muestras se colocaron en el termociclador Select Cycler II de la marca Select BioProducts (Figura 5) bajo las siguientes condiciones de ciclado térmico: desnaturalización inicial a 95 °C, 2 min; seguido de 30 ciclos a 95 °C, 30 s; alineación 30 ciclos a 60 °C, 30 s; extensión a 72 °C, 1 min y una extensión final a 72 °C, 2 min.



Figura 5. Termociclador Select Cycler II de la marca Select BioProducts. Tomada por Hernández Assereth.

Electroforesis en gel de agarosa

Posterior a la amplificación, se preparó un gel de agarosa al 1 % de acuerdo con la capacidad de la cámara de electroforesis. Para ello, se disolvieron 0.8 g de agarosa en 80 ml de TAE 1X y 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Se cargaron en el gel las muestras de tejido, los controles y 0.5 µg de marcador de peso molecular. El gel se corrió a 60 V por 80 min y los resultados se visualizaron en un transiluminador UV.

METAS ALCANZADAS

En el presente trabajo se cumplió el objetivo principal: Identificar la presencia de *L. interrogans* serovariedad Canicola en tejidos del Modelo Animal hámster (*Mesocricetus auratus*) en condiciones de inmunocompetencia.

Se logró la extracción de ADN de calidad a partir de cada uno de los tejidos mediante el método orgánico de fenol-cloroformo-proteinasa K, lo cual se corroboró mediante la cuantificación por espectrofotometría. Así mismo, se estableció y aplicó exitosamente la técnica de PCR para la detección de ADN de *Leptospira*, obteniéndose señales de amplificación bajo las condiciones experimentales establecidas.

Finalmente, con los resultados obtenidos se evaluó el impacto del estado inmunológico de los hámsteres inmunocompetentes sobre la infección durante los días posteriores a la infección.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

A partir de muestras de hígado, bazo, riñón, pulmón, cerebro, corazón y ojo de los dos grupos de hámsteres evaluados: 1) animales inoculados con *L. interrogans* serovariedad Canicola, sacrificados a diferentes días posterior a su infección, y 2) pertenecientes al grupo no inoculado, y con el fin de evaluar la presencia o ausencia de ADN de *Leptospira* en cada uno de estos órganos se obtuvieron los siguientes resultados.

Los resultados se presentan de manera general debido a que forman parte de una investigación en proceso y están sujetos a publicación.

La cuantificación por espectrofotometría de las muestras de ADN presentó valores de relación A260/280 entre 1.2 y 2.0, por su parte, los valores de la relación A260/A230 oscilaron entre 0.6 y 2.0; aunque algunos de estos valores se encuentran por debajo del valor óptimo reportado (1.8 a 2), fueron adecuados para la realización de la PCR, ya que no se observó inhibición de la amplificación (Figura 6).

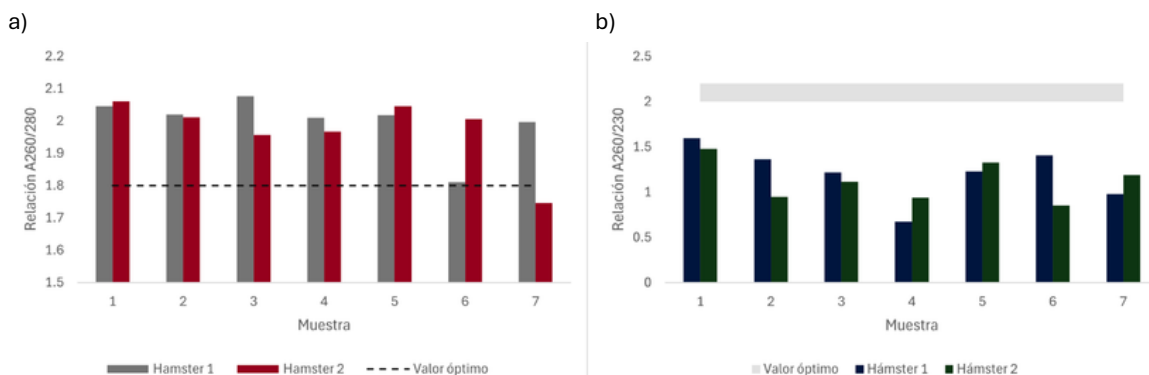


Figura 6. Gráficas de las relaciones de pureza de 14 muestras de ADN (2 hámsteres): a) valores de relación A260/280; b) valores de la relación A260/A230.

Las relaciones de absorbancia A260/280 y A260/230 se emplean comúnmente como indicadores de pureza de ADN, donde valores menores a los óptimos pueden reflejar la presencia de contaminantes como proteínas (A260/280), así como sales o compuestos orgánicos residuales (A260/230), los cuales potencialmente pueden inhibir la actividad de la ADN polimerasa. Sin embargo, estudios previos como los reportados por Dilhari *et al.*, en 2017 y Sloan *et al.*, en 2021 han demostrado que en muestras de ADN obtenidas mediante distintos métodos de extracción es común encontrar valores bajos de estas relaciones, sobre todo en la relación A260/230. Aun así, pueden producir amplificaciones exitosas mediante PCR debido a que los contaminantes detectados por espectrofotometría no se encuentran en concentraciones suficientes para inhibir la actividad de la ADN polimerasa. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio.

En una proporción de los hámsteres inoculados evaluados, el análisis por PCR permitió identificar productos de amplificación compatibles con la presencia de *Leptospira* en distintos órganos. En contraste, en otra parte de las muestras no se observaron productos de amplificación en ninguno de los órganos analizados.

La diferencia observada en la detección de *L. interrogans* entre los diferentes días post infección está relacionada con la evolución natural de la infección en hámsteres. De

acuerdo con lo reportado por Maruoka *et al.*, en 2021 y Coutinho *et al.*, en 2014, durante la fase temprana de la enfermedad ocurre la diseminación hematológica de la bacteria lo que permite su detección en múltiples tejidos. Sin embargo, conforme avanza el tiempo de la infección, la carga bacteriana disminuye como consecuencia de la activación de la respuesta inmune del hospedero, correspondiente a la fase inmunitaria, la cual fue descrita a partir de los días 8 y 9 después de la infección, favoreciendo la eliminación progresiva del patógeno en ciertos órganos, lo que puede limitar su detección mediante técnicas moleculares. Por ejemplo, Coutinho *et al.* en 2014 reportaron mediante la técnica de inmunofluorescencia la presencia de *Leptospira* en el riñón de hámsteres entre los días 7 y 16 días post infección; sin embargo, a partir de los días 28 a 56 la detección fue mínima.

Este comportamiento concuerda con la detección observada en algunas muestras y la ausencia de amplificación en otras del presente estudio. En ninguna de las muestras correspondientes a los hámsteres evaluados del grupo control se observó amplificación, lo que respalda la especificidad del ensayo.

Para garantizar la confiabilidad de la PCR, se incluyeron controles positivo, negativo y NTC (sin ADN molde) en cada corrida, con el fin de verificar la especificidad de la reacción y la ausencia de contaminación. Los controles mostraron el comportamiento esperado bajo las condiciones experimentales, confirmando la adecuada aplicación de la técnica, su especificidad y robustez. Los productos de amplificación observados presentaron el tamaño esperado en referencia al marcador de peso molecular utilizado (Figura 7).

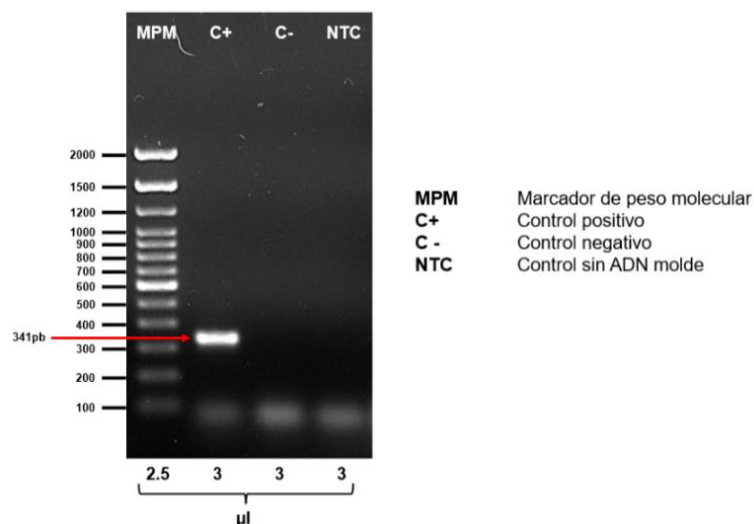


Figura 7. Amplificación por PCR de los controles: positivo (341 pb), negativo y NTC con los iniciadores Can F y Can R utilizados para la identificación de *L. interrogans* serovariedad Canicola.

Conclusiones

En este estudio se logró identificar la presencia de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola en tejidos de hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) en condiciones de inmunocompetencia mediante la técnica de PCR.

La obtención adecuada de ADN permitió la aplicación de la PCR, demostrando que el método de extracción empleado fue apropiado para el análisis molecular de los tejidos animales, aun cuando se obtuvieron variaciones en las relaciones de absorbancia por espectrofotometría.

La detección de la presencia de ADN de *L. interrogans* en algunos tejidos de los hámsteres infectados y su ausencia en otros, sugieren la dinámica temporal de la infección asociada con la activación de la respuesta inmune en hámsteres inmunocompetentes.

Los resultados obtenidos pueden utilizarse como información base sobre la dinámica temporal de la infección por *L. interrogans* en un modelo animal inmunocompetente en estudios futuros para profundizar en la respuesta inmunológica y la persistencia tisular del patógeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abguguen, P. (2014). Leptospirosis. *EMC - Tratado de Medicina*, 18(4), 1–10.
- Adler, S. (1948). Origin of the golden hamster *Cricetus auratus* as a laboratory animal. *Nature*, 162(4111), 256–257.
- Andrade-Silveira, E., Ortega-Pacheco, A., Jiménez-Coello, M. y Cárdenas-Marrufo, M. (2024). Review of leptospirosis in dogs from Mexico: Epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment. *Veterinary World*, 17(6), 1356–1361.
- Aranzazu, A. D., Apraez, L. y Ortiz-Marín, D. C. (2020). Leptospirosis en pediatría, un diagnóstico a tener en cuenta. *Revista Chilena de Infectología*, 37(6), 728–738.
- Arent, Z., Pardyak, L., Dubniewicz, K., Plachno, B. y Kotula-Balak, M. (2022). *Leptospira* taxonomy: then and now. *Medycyna Weterynaryjna-Veterinary Medicine-Science and Practice*, 78(10), 489–496.
- Baron, S. (Ed.). (1996). Medical Microbiology (4a ed.). The University of Texas Medical Branch at Galveston. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8451/>
- Burbano, E. M., Caetano de Almeida, B., Otero, I. y Álvarez, S. (2017). *Manual de biología molecular: Procedimientos básicos*. (p. 85) Colombia: Universidad de Nariño.

- Cagliero, J., Huet, K. y Matsui, M. (2020). Capítulo 22 Use of golden syrian hamster as an animal model to study leptospirosis-associated immune responses. *En*: N. Koizumi y M. Picardeau (Eds.), *Leptospira spp: Methods and Protocols* (pp. 243–256). New York: Springer US.
- Cai, C. S., Zhu, Y. Z., Zhong, Y., Xin, X. F., Jiang, X. G., Lou, X. L., He, P., Qin, J. H., Zhao, G. P., Wang, S. Y. y Guo, X. K. (2010). Development of O-antigen gene cluster-specific PCRs for rapid typing six epidemic serogroups of *Leptospira* in China. *BMC Microbiology*, Mar 3;10:67.
- Chacko, C. S., Lakshmi, S. S., Jayakumar, A., Binu, S. L., Pant, R. D., Giri, A., Chand, S. y Up, N. (2021). A short review on leptospirosis: Clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Clinical Epidemiology and Global Health*, 11, 100741.
- Coutinho, M. L., Matsunaga, J., Wang, L.-C., de la Peña Moctezuma, A., Lewis, M. S., Babbitt, J. T., Aleixo, J. A. G. y Haake, D. A. (2014). Kinetics of *Leptospira interrogans* infection in hamsters after intradermal and subcutaneous challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(11), 1–9.
- Dilhari, A., Sampath, A., Gunasekara, C., Fernando, N., Weerasekara, D., Sissons, C., McBain, A., y Weerasekera, M. (2017). Evaluation of the impact of six different DNA extraction methods for the representation of the microbial community associated with human chronic wound infections using a gel-based DNA profiling method. *AMB Express*, 7(1), 179.
- Gallegos-Mesén, A. y Leandro-Sandi, V. (2010). Leptospirosis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 67(592), 115–121.
- Giraud-Gatineau, A., Nieves, C., Harrison, L. B., Benaroudj, N., Veyrier, F. J. y Picardeau, M. (2024). Evolutionary insights into the emergence of virulent *Leptospira* spirochetes. *PLOS Pathogens*, 20(7), 1–21.
- Gomes-Solecki, M., Santecchia, I. y Werts, C. (2017). Animal Models of Leptospirosis: Of mice and hamsters. *Frontiers in Immunology*, 8, 1–20.
- Haake, D. A. y Matsunaga, J. (2021). Leptospiral Immunoglobulin-Like Domain Proteins: Roles in Virulence and Immunity. *Frontiers in immunology*, 11, 579907.
- Inamasu, Y., Nikaido, Y., Miyahara, S., Maruoka, T., Takigawa, T., Ogawa, M., Nakayama, T., Harada, M. y Saito, M. (2022). Dissemination of *Leptospira* into the intestinal tract resulting in fecal excretion in a hamster model of subcutaneous infection with *Leptospira interrogans*. *Microbial Pathogenesis*, 165, 105481.
- Jasso-Obregón, J. O., Hernández-Contreras, S., Alva-Pérez, J., Benavides-González, F., Pérez-Tovar, F. E., Rosas-Mejía, M. y Reyes-Zepeda, F. (2024). Tendencias mundiales de la investigación de leptospirosis y serovares en perros presentes en México. *Ciencias Veterinarias y Producción Animal*, 1(2), 48–59.

- Kurilung, A., Keeratipusana, C., Horiike, T., Suriyaphol, P., Hampson, D. J. y Prapasarakul, N. (2019). Chronology of emergence of the genus *Leptospira* and over-representation of gene families enriched by vitamin B2, B12 biosynthesis, cell adhesion and external encapsulating structure in *L. interrogans* isolates from asymptomatic dogs. *Infection, Genetics and Evolution*, 73, 7-12.
- Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 296–326.
- Maruoka, T., Nikaido, Y., Miyahara, S., Katafuchi, E., Inamasu, Y., Ogawa, M., Fukuda, K., Nakayama, T., Horishita, T. y Saito, M. (2021). Correlation between renal distribution of leptospires during the acute phase and chronic renal dysfunction in a hamster model of infection with *Leptospira interrogans*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(6), 1–19.
- Mukherjee, P., Roy, S., Ghosh, D. y Nandi, S. K. (2022). Role of animal models in biomedical research: a review. *Laboratory Animal Research*, 38(1), 1–17.
- Nagraik, R., Kaushal, A., Gupta, S., Sharma, A. y Kumar, D. (2020). Leptospirosis: A Systematic Review. *Journal of Microbiology, Biotechnology & Food Sciences*, 9(6), 1099–1109.
- Nikaido, Y., Ogawa, M., Fukuda, K., Saito, M., Yokoyama, M., Kanemaru, T. y Nakayama, T. (2019). Transbronchial invasion and proliferation of *Leptospira interrogans* in lung without inflammatory cell infiltration in a hamster model. *Infection and Immunity*, 87(12).
- Oda, Y., Sadakane, K., Yoshikawa, Y., Imanaka, T., Takiguchi, K., Hayashi, M., Kenmotsu, T., y Yoshikawa, K. (2016). Highly concentrated ethanol solutions: Good solvents for DNA as revealed by single-molecule observation. *Chemphyschem*, 17(4), 471–473.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (Eds). (2001). *Molecular cloning a laboratory manual*, 3ª ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2344.
- Secretaría de Salud. (2025). Boletín epidemiológico semana 22. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 42(22), 1–84.
- Sloan, S., Jenvey, C. J., Piedrafita, D., Preston, S., y Stear, M. J. (2021). Comparative evaluation of different molecular methods for DNA extraction from individual *Teladorsagia circumcincta* nematodes. *BMC Biotechnology*, 21(1), 35.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2), 70–78.
- Torres-Castro, M., Hernández-Betancourt, S., Agudelo-Flórez, P., Arroyave-Sierra, E., Zavala-Castro, J. y Puerto, F. I. (2016). Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis. *Revista Médica del IMSS*, 54(5), 620–625.
- Valentine, H., Daugherty, E. K., Singh, B. y Maurer, K. J. (2012). Capítulo 34 The experimental use of syrian hamsters. *En: M. A. Suckow, K. A. Stevens y R. P. Wilson*

(Eds.), *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents* (pp. 875–906). New York: Elsevier.

- Vernel-Pauillac, F., Murray, G. L., Adler, B., Boneca, I. G. y Werts, C. (2021). Anti-*Leptospira* immunoglobulin profiling in mice reveals strain specific IgG and persistent IgM responses associated with virulence and renal colonization. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(3), 1–28.
- Yescas-Benítez, J. E., Rivero-Pérez, N., Montiel-Díaz, H. E., Valladares-Carranza, B., Peláez-Acero, A., Morales-Ubaldo, A. L. y Zaragoza-Bastida, A. (2020). Comportamiento epidemiológico de la leptospirosis en México durante el periodo 2013-2019. *Revista de Salud Pública*, 22(4), 1–7.

ANEXOS

Anexo 1. Reactivos y soluciones para extracción de ADN

- Etanol de grado molecular y al 75 %
- Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v)
- Acetato de sodio 3 M
- Solución SNET y Proteinasa K (1.06 ml):

Reactivo	Concentración	Volumen final (µl)
Tris (pH 8)	1 M	40
EDTA	0.5 M	400
NaCl	1 M	200
SDS	10 %	400
Proteinasa K	20 mg/ml	20
Volumen total		1060 µl

- Solución TE (10 ml):

Reactivos	Concentración	Concentración final	Volumen final (µl)
Tris (pH 8)	1 M	10 mM	0.5
EDTA	0.5 M	1 mM	0.1
Agua destilada estéril	-	-	49.4
Volumen total			50

Anexo 2. Equipo para extracción de ADN

- Centrífuga
- Pistilo de plástico (estéril)
- Micropipetas (20, 200 y 1000 µl)
- Tubos para microcentrífuga de 1.5 y 2 ml.
- Baño María

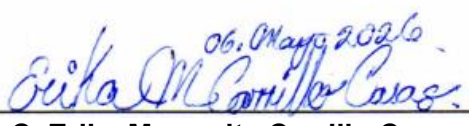
Anexo 3. Reactivos para PCR

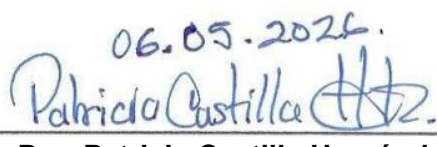
Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen final (µl)
Buffer Colorless 5 X	5 X	1 X	10
Solución de MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	3
dNTP's	10 mM c/u	0.2 mM c/u	1
Iniciador can-F (CAA AGG TGA TTC ACA AGG)	10 µM	0.1 µM	0.5
Iniciador can-R (TCA GTG CAT TAG CCG TAT)	10 µM	0.1 µM	0.5
GoTaq® ADN polimerasa	5 u/µl	1.25 u/ul	1.25
Agua ultrapura estéril	-	-	28.75
ADN de la muestra	100 ng/µl	-	5
Volumen total			50

Anexo 4. Equipo para PCR

- Termociclador
- Cámara de electroforesis
- Micropipetas (10, 20, 200 y 1000 µl)
- Tubos para centrifuga de 600 µl
- Tubos para PCR (200 µl)
- Cámara UV
- Transiluminador de rayos UV

VISTO BUENO DE LOS ASESORES


M en C. Erika Margarita Carrillo Casas
 Ced. Prof.: 4556989
 Investigadora en Ciencias Médicas
 Depto. Biología Molecular e
 Histocompatibilidad
 Subdirección de Enseñanza e Investigación
 Hospital General "Dr. Manuel Gea González"


Dra. Patricia Castilla Hernández
 Núm. Económico: 30606
 Laboratorio de Biotecnología Ambiental
 Depto. El Hombre y su Ambiente
 Universidad Autónoma Metropolitana
 Unidad Xochimilco