



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DE LA CAPTURA DEL REGULADOR C4BP POR CEPAS
DE BAJO Y ALTO PASAJE DE *Leptospira* spp. Y EL EFECTO EN SU
SOBREVIVENCIA AL SISTEMA DE COMPLEMENTO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL**

PRESENTA:

ANGIE CAROLINA SIERRA VARGAS

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. ALFREDO SAHAGÚN RUIZ

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

Dra. MARIA GUADALUPE GORDILLO PÉREZ

IMSS CMN, Siglo XXI

Ciudad Universitaria, Ciudad de México.

Septiembre, 2024.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Universidad Nacional Autónoma de México
Secretaría General
Coordinación General de Estudios de Posgrado

DR. JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT
Programa de Maestría y Doctorado en
Ciencias de la Producción y la Salud Animal
Presente

Quien suscribe, Dr. Alfredo Sahagún Ruiz, tutor principal de Angie Carolina Sierra Vargas, con número de cuenta 522462555, integrante del alumnado de Maestría en Ciencias de la Producción y la Salud Animal de ese programa, manifiesto bajo protesta de decir verdad que conozco el trabajo escrito de graduación elaborado por dicha persona, cuyo título es: "Evaluación de la captura del regulador C4BP por cepas de bajo y alto pasaje de *Leptospira* spp y el efecto en su sobrevivencia al sistema de complemento", así como el reporte que contiene el resultado emitido por la herramienta tecnológica de identificación de coincidencias y similitudes con la que se analizó ese trabajo, para la prevención de faltas de integridad académica.

De esta manera, con fundamento en lo previsto por los artículos 96, fracción III del Estatuto General de la UNAM; 21, primero y segundo párrafos, 32, 33 y 34 del Reglamento General de Exámenes y; 22, 49, primer párrafo y 52, fracción II del Reglamento General de Estudios de Posgrado, **AVALO** que el trabajo de graduación presentado se envíe al jurado para su revisión y emisión de votos, por considerar que cumple con las exigencias de rigurosidad académica previstas en la legislación universitaria.

Protesto lo necesario,

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de septiembre de 2024
Dr. Alfredo Sahagún Ruiz
Tutor principal



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

que presenté para obtener el grado de _____ es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

(Nombre, firma y Número de cuenta de la persona alumna)

Dedicatoria

"Pon en manos del Señor todas tus obras, y tus proyectos se cumplirán"

Proverbios 16:3

Este proyecto está dedicado a todas las personas que hicieron parte de este proceso, quienes, con su amor, palabras de ánimo, abrazos, comida, tiempo de calidad, etc. me ayudaron a permanecer firme en el camino.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme realizar mi posgrado, al departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia donde lleve a cabo los experimentos presentados en este proyecto.

Esta investigación fue financiada por la DGAPA-UNAM: PAPIIT IN-221021 e IN220324.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por la beca recibida para estudiar la Maestría CV 1153624.

A mi mamá, papá, hermana y mi mejor amiga y alma gemela Juliana por su amor, apoyo incondicional, han sido mis motores para continuar a pesar de los obstáculos, de las situaciones y de la distancia, siempre dándome palabras de ánimo.

A Krez, Maryana, Josse, Adolfo, Diego, Bren, Dalia, Cloé, Maren, Nikki, Yan, Citlalli, Ale, Pao O. y Cris fueron mi apoyo emocional, se convirtieron en más que amigos y no me dejaron desfallecer cuando sentía que ya no podía más con la carga, con su cariño, tiempo de calidad y palabras de aliento e incluso comida, me daban ánimo para seguir.

A Lucecita, mi colega, mi amiga, quien fue la persona que me ayudó a tener el contacto con mi tutor y poder realizar la Maestría.

A mi tutor el Dr. Alfredo Sahagún, quien desde el comienzo me ha dado su apoyo, conocimiento y ha estado al pie del cañón para que yo pudiera culminar la Maestría y a mi comité tutorial la Dra. Guadalupe Gordillo Pérez y el Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma, quienes desde el comienzo tuvieron toda la disposición para enseñarme, ayudarme, y corregirme para la mejora como persona y profesional.

A Nery mi compañero de laboratorio, quien me enseñó a manejar un cultivo de *Leptospira*, estuvo apoyándome todo momento y ha sido una persona clave para que yo aún continué aquí en México.

A la Dra. Laura Cobos, Dra. Ana Delia y a Dr. Daniel Nájera que me brindaron su apoyo, tiempo, conocimiento y consejos con los resultados de los experimentos; al Dr. Antonio Verdugo y su laboratorio LMM, quien me permitió usar sus equipos y espacio en el laboratorio cuando lo requerí para realizar los experimentos y en especial a Jules, que me dio la luz cuando no podía ver más allá y gracias a su conocimiento me permitió ver alternativas y soluciones.

A los miembros del jurado la Dra. Betty, Dra. Bertha y Dra. Susana por su revisión en el escrito y apoyo para los trámites.

Resumen

Las especies patógenas de *Leptospira* spp., evaden el sistema del complemento por medio de la captura de reguladores solubles de las vías alternativa, clásica y lectinas como el factor H, C4BP y vitronectina, utilizando proteínas de unión a estos reguladores, que expresan en su superficie: LenA, LenB y EF-Tu, se unen al factor H; Lsa30 se une a C4BP; LigA, LigB, Lsa23, LcpA y enolasa se unen tanto al factor H como a C4BP y LcpA además se une a la vitronectina. La captura de estos reguladores conduce a la interrupción de la activación del complemento, en consecuencia, *Leptospira* evita la opsonización y la formación del complejo de ataque de membrana (MAC). Se evaluó la capacidad de captura de C4BP entre las cepas patógenas de *Leptospira*: LOCaS46 (*L. interrogans* sv Canicola), LOVE30 (*L. interrogans* sv Icterohaemorrhagiae) y MOCA45 (*L. santarosai* sv Tarassovi), de bajo pasaje y su correspondiente cepa atenuada en cultivo (alto pasaje), así como de la cepa saprofita de referencia Patoc I de *Leptospira biflexa* sv Patoc como control. La unión al regulador fue evaluada por ELISA y confirmada por Western blot. Adicionalmente, se evaluó la sobrevivencia de estas cepas de *Leptospira* spp., en suero humano normal (SHN). Las cepas de bajo pasaje tuvieron una mayor capacidad de unión al regulador C4BP, frente a las atenuadas, indicando que se pierde la capacidad de evadir la vía clásica y de las lectinas del sistema de complemento por atenuación en cultivo. La sobrevivencia correlacionó positivamente con la capacidad de captura.

Palabras clave: Leptospirosis; *Leptospira*; Sistema de complemento; C4BP; Proteínas de unión a C4BP

Abstract

The pathogenic species of *Leptospira* spp. evade the complement system by capturing soluble regulators of the alternative, classical pathways and lectins such as factor H, C4BP and vitronectin, using surface expressed proteins that bind to these regulators: LenA, LenB and EF-Tu, bind to factor H; Lsa30 binds to C4BP; LigA, LigB, Lsa23, LcpA and enolase bind both factor H and C4BP, additionally LcpA binds vitronectin. Capture of these regulators leads to disruption of complement activation, consequently, *Leptospira* prevents opsonization and formation of the membrane attack complex (MAC). The C4BP capture capacity was evaluated among the pathogenic low passage *Leptospira* strains: LOCaS46 (*L. interrogans* sv *Canicola*), LOVe30 (*L. interrogans* sv *Icterohaemorrhagiae*) and MOCA45 (*L. santarosai* sv *Tarassovi*), and its corresponding attenuated strain in culture (high passage), and also the saprophytic reference strain Patoc I of *Leptospira biflexa* sv *Patoc* as a control. Binding to the regulator was evaluated by ELISA and confirmed by Western blot. Additionally, the survival to normal human serum (NHS) of the strains of *Leptospira* spp. was evaluated. The low passage strains had a greater binding capacity to the C4BP regulator, compared to the attenuated ones, indicating that the ability to evade the classical pathway and the lectins of the complement system is lost due to attenuation in culture. Survival correlated positively with capture capacity.

Keywords: Leptospirosis; *Leptospira*; Complement system; C4BP; C4BP binding proteins

Contenido

Dedicatoria.....	I
Agradecimientos	II
Resumen	III
Abstract.....	IV
Lista de Figuras	VIII
Lista de Cuadros.....	VIII
Evaluación de la captura del regulador C4BP por cepas de bajo y alto pasaje de <i>Leptospira</i> spp. y el efecto en su sobrevivencia al sistema de complemento.....	9
I. INTRODUCCIÓN	9
Leptospirosis.....	9
<i>Leptospira</i>	10
Clasificación.....	11
Serovariedades adaptadas	14
Transmisión	17
Patogenia.....	17
Factores de virulencia	18
Sistema de Complemento.....	23
Adquisición de plasminógeno del hospedero.....	25
Secreción de proteasas	26
Reclutamiento de reguladores del Sistema de Complemento	27
Proteína de unión a C4b	27
Vacunas.....	32
Justificación	34
Hipótesis.....	35
Objetivos	35
Objetivo general	35
Objetivos específicos	35
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
Suero Humano Normal (SHN)	37

Cultivo de <i>Leptospira</i> spp.....	37
Ensayo de captura de C4BP por <i>Leptospira</i> (ELISA)	38
Ensayo de sobrevivencia	39
Captura de C4BP por <i>Leptospira</i> spp vivas de bajo pasaje y atenuadas	40
Correlación entre la capacidad de captura de C4BP y sobrevivencia frente al 40% SHN	41
Análisis estadístico	41
III. RESULTADOS	44
Captura de C4BP por sv de <i>Leptospira</i> spp. de bajo pasaje y atenuadas mediante ELISA.....	44
Sobrevivencia de serovariedades de <i>Leptospira</i> spp. de bajo pasaje y atenuadas en 40% de SHN	47
Correlación entre la capacidad de captura de C4BP y la capacidad de sobrevivencia en 40% de SHN	49
Captura de C4BP por serovariedades de <i>Leptospira</i> spp. vivas de bajo y alto pasaje mediante la técnica de Western blot	51
IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	53
V. LITERATURA CITADA.....	60
Referencias.....	60
Abreviaturas.....	65
Anexos	67
Anexo 1. Preparación de medio EMJH modificado 500 mL.....	67
Anexo 2. Preparación de soluciones para ELISA	68
Anexo 3. Protocolo para el ensayo de ELISA para determinar la capacidad de captura de C4BP por cepas de <i>Leptospira</i> spp. (Moreno et al., 2019, modificado)	69
Anexo 4. Protocolo para el ensayo de sobrevivencia frente al 40% de SHN de cepas de <i>Leptospira</i> spp. (Barbosa et al., 2009; Moreno et al., 2019).....	71
Anexo 5. Preparación de soluciones para SDS-PAGE 10% y Western blot	72
Anexo 6. Protocolo de SDS-PAGE 10% (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio).....	74
Anexo 7. Tabla de datos de Captura del regulador C4BP en 40% de SHN por cepas de bajo y alto pasaje de <i>Leptospira</i> spp.	76

Anexo 8. Porcentaje de sobrevivencia al 40% de SHN en cepas de bajo y alto pasaje de <i>Leptospira</i> spp.....	77
Anexo 9. Porcentajes de captura de C4BP en D.O. 492 nm y sobrevivencia en 40% de SHN y sus respectivos arcosenos de cepas de bajo y alto pasaje de <i>Leptospira</i> spp.	78
Anexo 10. Formato del consentimiento informado.....	79

Lista de Figuras

Figura 1. Árbol filogenético del género <i>Leptospira</i> spp., basado en 1371 genes ortólogos.	13
Figura 2. Morfología celular de <i>Leptospira</i> spp.	20
Figura 3. Estructura de C4BP.	29
Figura 4. Captura de C4BP por <i>Leptospira</i> spp., de bajo pasaje y sus respectivas cepas atenuadas por cultivo	46
Figura 5. Porcentaje de sobrevivencia en serovariedades de <i>Leptospira</i> spp. de bajo y alto pasaje	48
Figura 6. Correlación entre la capacidad de captura de C4BP y la capacidad de sobrevivencia frente al suero humano normal de cepas de bajo pasaje de <i>Leptospira</i> spp y sus homólogos atenuadas.	50
Figura 7. Captura de C4BP por <i>Leptospira</i> spp. vivas, de bajo pasaje y sus respectivas cepas atenuadas por cultivo por Western blot	52

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Algoritmo de trabajo	36
Cuadro 2. Cepas utilizadas	37
Cuadro 3. Pasos de la metodología	42

Evaluación de la captura del regulador C4BP por cepas de bajo y alto pasaje de *Leptospira* spp. y el efecto en su sobrevivencia al sistema de complemento

I. INTRODUCCIÓN

Leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad infectocontagiosa en mamíferos y es una zoonosis emergente de distribución global (1), con una alta incidencia, anualmente a nivel mundial se reporta una morbilidad de 1.03 millones y una mortalidad de 58,900 casos (2). Se considera un problema de salud pública, principalmente en poblaciones en estado de pobreza en países en desarrollo y ha producido grandes brotes en el sudeste asiático, América Central y del Sur (3). La enfermedad es causada por serovariedades patógenas del género *Leptospira*; existen serovariedades adaptadas a hospedadores considerados de mantenimiento, quienes pueden presentar una infección asintomática o crónica y las serovariedades no adaptadas a hospedadores incidentales, quienes pueden manifestar signos de enfermedad aguda (1). Debido a que *Leptospira* es una bacteria acuática, esta enfermedad se presenta mayormente después de grandes inundaciones, también se le ha asociado a riesgo ocupacional en individuos que desarrollan actividades como la ganadería, inspección de carne en rastros, control de roedores, medicina veterinaria, desazolve del drenaje, cultivo de arroz y minería, ya que la fuente de infección en humanos es por el contacto indirecto con agua o lodo contaminado con orina de animales infectados con *Leptospira*, o bien por contacto directo con la orina, algunas secreciones o tejidos de animales infectados (4).

Esta enfermedad tiene varias presentaciones clínicas en humanos que pueden ir desde una enfermedad febril leve hasta una enfermedad más grave como el síndrome de Weil caracterizado por: ictericia, insuficiencia hepatorenal y hemorragia; o en otros casos puede causar el síndrome hemorrágico pulmonar grave (5). La presentación clínica en animales suele ser parecida a la observada en humanos, sin embargo, hay diferencias importantes, en perros se presentan manifestaciones clínicas adicionales como vómito, diarrea, síndrome urémico y reproductivo, en caballos se puede observar uveítis recurrente y trastornos reproductivos, mientras que en bovinos y porcinos sobresale la afectación reproductiva (6).

Leptospira

Leptospira es una espiroqueta, que mide aproximadamente 0.1 μm de diámetro por 6 a 20 μm de longitud, aerobia obligada y móvil. Esta bacteria pertenece a la familia *Leptospiraceae*, orden Spirochaetales, las leptospiras tienen doble membrana, una membrana citoplasmática, estrechamente asociada con peptidoglicano de la pared celular, y la membrana externa, con LPS similar al de las bacterias Gram negativas (6). La espiroqueta tiene un crecimiento óptimo entre 28 a 30°C y produce enzimas como catalasa y oxidasa (4). El genoma de *Leptospira* consta de dos cromosomas y se han hecho estudios genómicos en China donde se confirma la heterogeneidad que posee el género *Leptospira*, ya que dentro de las especies patógenas e incluso serovariedades, se observan diferencias tanto en cantidad de plásmidos como en tamaño de los mismos (7).

Las especies patógenas incluyen *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. noguchii* y *L. weillii*, de éstas, *L. interrogans* y *L. borgpetersenii* tienen mayor prevalencia en el mundo (7). En *L. interrogans*

se han realizado más estudios genómicos, en donde en la serovariedad Lai, se encontró una isla genómica de 54 kb, y en otras serovariedades de *L. interrogans* se han encontrado entre dos y tres plásmidos; mientras que en *L. borgpetersenii* serovar Ballum, hallaron dos plásmidos circulares (8). Se sabe que la integración de genomas de fagos y las islas genómicas le permiten a la bacteria adaptarse a nuevas condiciones ya sean ambientales o dentro del hospedero (8).

Un estudio de filogenia molecular basada en 1,371 secuencias de genes ortólogos encontró que el género *Leptospira*, está formado por 64 especies, agrupadas en dos clados S y P (S = saprofitas y P = patógenas) (9). Se han identificado más de 300 serovariedades patógenas de *Leptospira*, distribuidas entre 25 serogrupos diferentes de serovariedades antigénicamente similares que están caracterizadas con base en la diversidad antigénica de su polisacárido de la cadena O del LPS (10).

Clasificación

El clado P incluye especies de *Leptospira* que causan infecciones tanto en humanos como en animales, mientras que el clado S incluye especies de *Leptospira* exclusivamente no patógenas de vida libre, y nuevas especies aisladas del medioambiente en las cuales su virulencia aún no ha sido estudiada. Cada clado se subdivide en dos subclados (P1, P2, S1 y S2), el subclado P1 anteriormente descrito como el grupo patógeno, subclado P2 previamente descrito como el grupo intermedio, subclado S1 descrito antes como el grupo de saprofitas y S2 es el nuevo subclado, incluye especies que tienen características fenotípicas de saprofitas S1. Una característica que comparten los subclados S1 y S2 es la temperatura óptima de crecimiento, ya que estos crecen bien a 14°C, pero no a 37°C, esta es una diferencia importante con el clado P, ya que si pueden crecer

a temperatura de 37°C. Los subclados S, también crecen en el medio EMJH suplementado con el análogo 8-azoguanina, que se ha usado para separar especies patógenas de saprofitas (9).

Los genomas de las especies pertenecientes al subclado P1, tienden a ser más divergentes, más grandes y con un contenido de GC mayor y disperso, albergan más genes que codifican ARNt y poseen una proporción de codificación menor, y tienen mayor cantidad de pseudogenes; mientras que las especies del subclado P2, comparten dos características de P1 en cuanto al contenido de GC y contener más genes que codifican ARNt. Los subclados P1 y P2 podrían tener una mayor cantidad de genes, que codifican factores de virulencia, en contraste con los subclados S1 y S2 que tienen una mayor cantidad de genes asociados a su sobrevivencia en el medio ambiente (9).

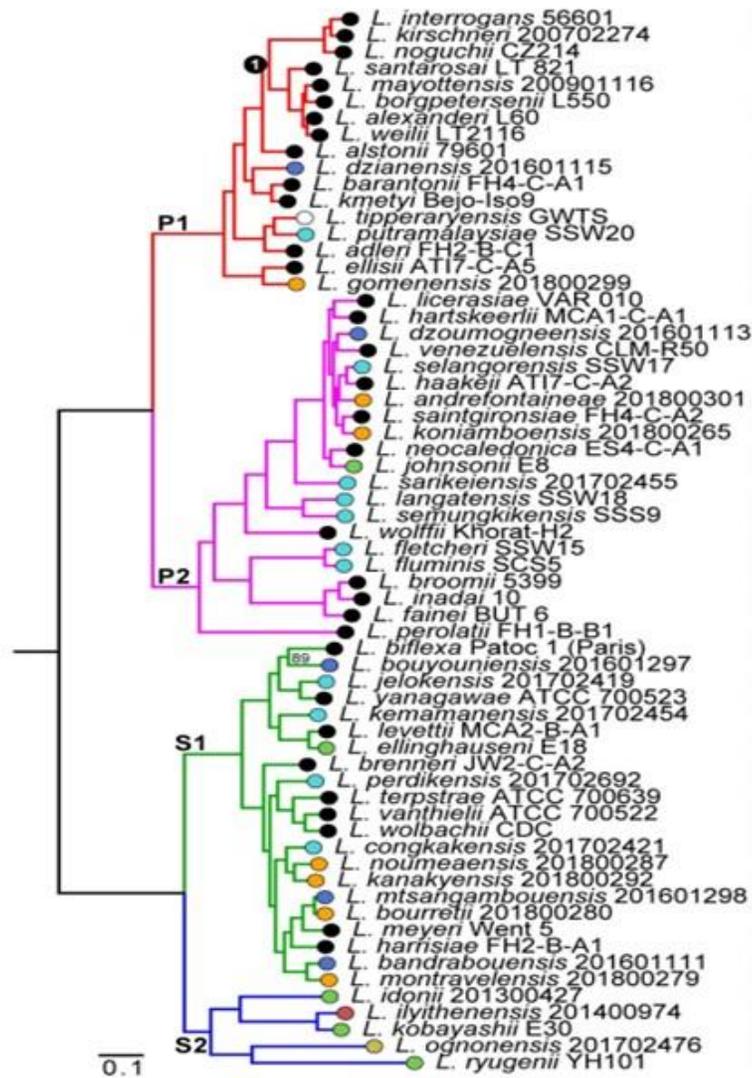


Figura 1. Árbol filogenético del género *Leptospira* spp., basado en 1371 genes ortólogos. Clasificación molecular del género *Leptospira* spp., se muestran los dos clados P= Patógenas y S= Saprófitas, dividido en cuatro subclados mostrados por colores. P1 (rojo), P2 (fucsia), S1 (verde), S2 (azul). Imagen modificada de: Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, Ismail N, Mohd Khalid MKN, Amran F, Masuzawa T, Nakao R, Amara Korba A, Bourhy P, Veyrier FJ, Picardeau M. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 May 23;13(5): p. e0007270. doi: 10.1371/journal.pntd.0007270 (9).

Serovariedades adaptadas

Las serovariedades incidentales generalmente provocan infecciones agudas mientras que las serovariedades adaptadas suelen causar infecciones crónicas o algunas veces subclínicas. En caballos, *Leptospira interrogans* serogrupo Australis serovariedad Bratislava, es adaptada al hospedero, mientras que el serogrupo Pomona sv Kennewicki, es incidental en Estados Unidos y Canadá, sin embargo, en las regiones tropicales la serovariedad más prevalente es *L. interrogans*, serogrupo Icterohaemorrhagiae sv Copenhageni (11). En un estudio serológico realizado en Brasil, compararon diferencias en la manifestación clínica de yeguas infectadas con serovariedad Bratislava y Copenhageni, obtuvieron como resultado una fuerte asociación entre la serovariedad Bratislava con problemas reproductivos, como muerte embrionaria temprana, muerte perinatal y aborto en comparación con la serovariedad Copenhageni, que, aunque es más prevalente la manifestación clínica fue menor (11). Adicionalmente, una manifestación inmunológica crónica que se presenta en caballos es la uveítis recurrente, en donde los anticuerpos dirigidos contra proteínas leptospirales LruA y LruB, tienen una reacción cruzada con componentes del humor vitreo y acuoso (12).

En Brasil la leptospirosis en cerdos es crónica frecuentemente, con un alto impacto económico y al igual que los caballos también tiene una asociación en problemas reproductivos, las serovariedades más comunes son: Pomona, Icterohaemorrhagiae, Copenhageni y Tarassovi. En cerdos la serovariedad adaptada es Pomona y provoca aborto, muerte fetal o que los lechones nazcan débiles o enfermos; la serovariedad Bratislava, también se aislado de placentas, en lechones débiles e infertilidad, aunque es poco frecuente; sin embargo, en Vietnam se presentan las serovariedades Autumnalis, Bratislava y Grippotyphosa, mientras que en

los Estados Unidos ha reportado a Bratislava como la serovariedad más importante (13).

La serovariedad Hardjo es adaptada al ganado bovino, teniendo una distribución alta a nivel mundial, la cepa más común que mantiene el ganado bovino pertenece a *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjobovis; sin embargo, en algunas partes del mundo como Escocia e Irlanda del Norte se encontró a *L. interrogans* serovariedad Hardjoprajitno en infecciones mixtas con *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjobovis (14).

En bovinos lactantes la infección por *Leptospira* serovariedad Hardjo suele ser subclínica, ya sea por *L. borgpetersenii* (Hardjobovis) que es la más común a nivel global o por *L. interrogans* (Hardjoprajitno) que se ha encontrado en varias partes del mundo en el ganado (14). Sin embargo, la serovariedad Kennewicki también es común y persiste en esta especie, pero sólo se observa en América del Norte y Sur, Australia y Nueva Zelanda; mientras que la presentación grave de la enfermedad no es usual y está asociada a los serogrupos: Pomona, Icterohaemorrhagiae y Grippotyphosa (14). También se ha reportado que dentro de los serogrupos como Icterohaemorrhagiae, Canicola, Hebdomadis, Sejroe, Pyrogenes, Autumnalis, Australis, Javanica, Tarassovi y Grippotyphosa, varias serovariedades han ocasionado infecciones incidentales en esta especie en algunas partes del mundo (14).

Una especie que actúa como portador de serovariedades patógenas de *Leptospira interrogans*, son los caninos; la serovariedad Canicola solo es mantenida por esta especie y se le ha visto asociada al portar la infección renal asintomática en perros (15) (16), aunque en ocasiones se asocia con cuadros graves de enfermedad, probablemente asociada con estados de inmunodepresión (17). A nivel mundial, la infección incidental por serogrupos y/o serovariedades de Icterohaemorrhagiae, Copenhageni,

Pomona, Tarassovi, Sejroe y Hebdomadis, es relevante, ya que los informes indican que la especie canina no es portadora exclusiva de una serovariedad de *L. interrogans*, sino también se han visto involucradas otras especies como: *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. wolfii* y *L. santarosai* (16) y que una infección incidental en perros por la serovariedad Grippotyphosa, se daría por la presencia de roedores, quienes mantienen a esta serovariedad, la cual es común en Europa y América del Norte (18).

Se conoce que los roedores son reservorios de diferentes serovariedades de *Leptospira*; sin embargo, las ratas, como *Rattus norvegicus* (reservorios urbanos) son hospedadores de mantenimiento de las serovariedades que pertenecen a los serogrupos Icterohaemorrhagiae y Ballum en todo el mundo, mientras que los ratones *Mus musculus* y otras especies de *Mus* sólo mantienen el serogrupo Ballum (4) (19) (20).

Se conoce que no sólo las especies de producción y domésticas, son afectadas por la leptospirosis, también los anfibios, serpientes y peces de agua dulce podrían ser hospedadores potenciales de serovariedades patógenas de *Leptospira* y los animales usados como modelos de estudio (hámsteres y conejillos de Indias), quienes son susceptibles a la infección (1).

Muchas especies actúan como hospedadores de mantenimiento y/o reservorio de *Leptospira*; sin embargo, en la especie humana la infección siempre es incidental y está dada por diferentes factores, ya sean sociales, económicos, ambientales concurrentes con la exposición directa o indirecta a orina de animales infectados por *Leptospira* (4) (20).

Transmisión

La transmisión de esta enfermedad se debe al contacto con bacterias excretadas en orina de ratas, ratones, animales domésticos y de vida silvestre infectados con *Leptospira*, debido a que se mantiene de manera crónica en los túbulos renales (21), la orina contamina el agua y suelo promoviendo la propagación de la enfermedad, infectando a diversas especies de animales y humanos, incluso se ha informado la transmisión de *Leptospira*, en los suministros de agua (4) (6). En animales, aparte de un contacto directo con *Leptospira*, también puede darse la transmisión por contacto sexual, congénita y lactancia (1).

Patogenia

La adhesión de *Leptospira* en los tejidos es el primer paso para desencadenar una infección exitosa (3), las cuales se adhieren a una variedad de componentes del hospedador a través de proteínas de la superficie. Las serovariedades patógenas de *Leptospira* tienen gran importancia clínica ya que son altamente invasivas y tienen la capacidad de adherirse e invadir las células del hospedero más eficientemente en comparación con las serovariedades no patógenas (22).

La entrada de esta bacteria se da a través de las membranas mucosas o piel lesionada o reblandecida por inmersión en agua (23), al adherirse a tejidos para luego diseminarse rápidamente por vía hematológica, propagarse a órganos blancos y establecer una infección exitosa (3).

Factores de virulencia

Lipopolisacárido (LPS)

El LPS leptospiral, es el componente principal de la membrana externa, se asemeja al LPS de otras bacterias Gram negativas (24), está compuesto por: lípido A, un oligosacárido central conservado y un oligosacárido O (antígeno O) (25), aunque el Lípido A también conocido como la endotoxina, en *Leptospira* presenta menor actividad biológica, siendo menos tóxico y pirogénico, mientras que la cadena lateral O desencadena una fuerte respuesta inmunitaria en el hospedador (6), varía en tamaño entre las especies patógenas de las saprófitas, siendo mayor en las especies patógenas y se ha reconocido como un factor de virulencia importante (26).

Loa22

Es una lipoproteína que contiene un dominio OmpA C-terminal de 22 kDa (27) que media el enlace entre la membrana externa y la capa de peptidoglicano (3), puede formar un puente que enlaza el cilindro protoplásmico y se encuentra en la superficie de *Leptospira*, es esencial para su virulencia, ya que esta proteína promueve la adhesión a las células del huésped, para establecer una infección y diseminarse; adicionalmente se conserva entre serovariedades patógenas de *Leptospira* (28).

Se han identificado otras proteínas de *Leptospira* como: la porina OmpL1, las lipoproteínas LipL41 y LipL32 y una proteína de membrana periférica LipL45, algunas de estas han demostrado que están expuestas en la superficie y se expresan durante la infección, y pueden estar involucradas en la adherencia de la *Leptospira* a las células del hospedero (29) (30).

Adicionalmente, se han descubierto otras proteínas como la catalasa KatE, la chaperona molecular ClpB, que participa en la resistencia al estrés oxidativo, la Hem oxigenasa (HemO) responsable de la adquisición de hierro y una proteína de invasión intracelular homóloga que está presente en micobacterianas Mce, la cual podría explicar su capacidad para residir temporalmente en el interior de las células fagocíticas y no fagocíticas (3). *Leptospira* spp., tiene un sistema de secreción tipo II (T2SS), en el cual el poro de secreción está constituido por la secretina GspD, en un arreglo pentadecamérico (6).

Flagelo

Leptospira tiene dos flagelos periplásmicos que le permiten diseminarse a sus órganos blanco, se encuentran entre la membrana externa y el cilindro protoplásmico (31). El flagelo leptospiral consta de: el filamento, el gancho flexible y el complejo basal. El filamento es un cilindro hueco compuesto por cuatro subunidades: FlaB1, FlaB2, FlaB3 y FlaB4 que están encerrados por una cubierta exterior que se compone por las subunidades FcpA, FlaA1 y FlaA2 (32), adicionalmente, tiene el interruptor del motor flagelar FliY (3).

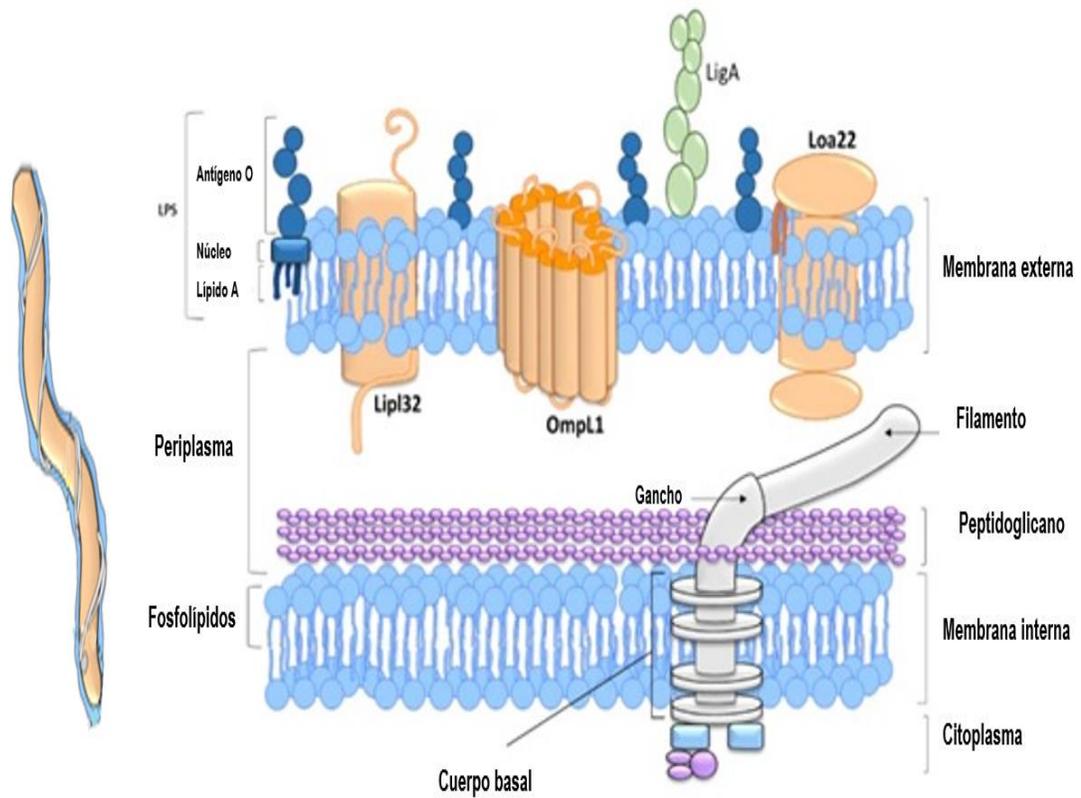


Figura 2. Morfología celular de *Leptospira* spp. La pared celular de *Leptospira* spp. está conformada por la membrana externa, la cual contiene el LPS compuesto por el Lípido A, el núcleo (polisacárido medular) y el antígeno O, entre la membrana externa y la membrana interna se encuentra el espacio periplásmico que contiene el peptidoglicano. La bacteria es móvil debido a dos flagelos periplásmicos, el flagelo leptospiral consta de: el filamento, el gancho y el cuerpo basal. Adicionalmente, se muestran algunas proteínas de membrana externa como Loa22, Lipl32, la porina OmpL1 y adhesinas como LigA. Imagen modificada de: Villarreal Julio RG, Murillo Ramo E, Ramírez García R, Peláez Sánchez RG, Agudelo Florez PM. A Narrative review generalities of the genus *Leptospira* and its virulence factors. Rev Med Hondur. 2022 Nov; 90(2). doi: <https://doi.org/10.5377/rmh.v90i2.15201> (33).

Adhesinas

Leptospira posee un conjunto de proteínas de superficie, que median la unión a las células del hospedero como: las proteínas similares a la endostatina, proteínas de tipo inmunoglobulina y otras proteínas que además de funcionar como adhesinas, se unen a reguladores del complemento (34).

Las proteínas similares a la endostatina, Len A, B, C, D, E y F, codificadas por 6 genes *len*, que están presentes en las serovariedades de *Leptospira* patógenas y se unen a la laminina del hospedador, colágenos tipo I y IV, fibronectina celular y plasmática, fibrinógeno, elastina (34).

Proteínas de tipo inmunoglobulina (Lig A, B, C) contienen una organización estructural con dominios repetidos y similares a los de las inmunoglobulinas, con función de adhesinas bacterianas, (35); y la proteína A adquisidora el regulador del complemento (LcpA), interactúan con componentes de lamatriz extracelular (ECM), y sirven como adhesinas durante la colonización (34).

Inicialmente, la proteína similar a la endostatina LenA, la nombraron proteína A de unión al Factor H de *Leptospira* (LfhA) por Verma y colaboradores en 2006 (36) y alternamente Barbosa A. y colaboradores en el mismo año de manera independiente, la nombraron adhesina de superficie leptospiral 24 (Lsa24) e informaron que se unía a la laminina (37). Finalmente, Stevenson B. y colaboradores en el año 2007 demostraron que LfhA yLsa24 son la misma proteína y que es capaz de interactuar con el Factor H, proteína1 relacionada con el Factor H (FHR-1) y la laminina del hospedero; además de esto,ellos demostraron que *Leptospira interrogans* contiene cinco genes homólogos adicionales a *lenA* y designaron *lenB*, *C*, *D*, *E* y *F*. LenA se une al Factor H y a FHR-1, LenB se une al FactorH y tiene mucha más afinidad por unirse a la

fibronectina, mientras que LenC, D, E y F exhiben más afinidad por la interacción con la laminina y fibronectina (38).

La proteína LcpA, antes LipL22, fue caracterizada y renombrada como proteína A de *Leptospira* adquisidora del regulador del complemento (LcpA) por Barbosa y col. 2010, debido a esta función en leptospirosis patógenas. Esta proteína de membrana externa es codificada por LIC11947e interactúa con C4BP humano, se sabe que esta proteína es conservada por especies patógenas de *Leptospira* (39).

Las serovariedades patógenas de *Leptospira* spp., son altamente invasivas tienen la capacidad de multiplicarse en tejido adiposo de la dermis, invadir la sangre (en ausencia de anticuerpos), adherirse y penetrar las células del hospedero y finalmente colonizar tejidos más eficientemente en comparación con las serovariedades no patógenas (3) (39).

Las serovariedades patógenas resisten a la actividad lítica del suero mediante la evasión de la respuesta inmune mediada por el sistema de complemento por medio de: la adquisición de plasminógeno del hospedero que activado a plasmina digieren proteínas del complemento en la superficie bacteriana, por la secreción de proteasas que degradan componentes del sistema de complemento y por el reclutamiento de reguladores solubles del complemento del hospedero que interfieren con estabilidad de la convertasa de C3 o con el complejo de ataque de membrana (MAC) (34) (40).

Sistema de Complemento

El sistema de complemento está conformado por más de 50 proteínas del suero y receptores de membrana, que interaccionan entre sí de manera regulada para dar inicio a una cascada de activación enzimática (41). Este sistema es uno de los mecanismos más antiguos en la evolución del sistema inmune; además de ser la primera línea de defensa contra patógenos de la inmunidad innata, también actúa como modulador de la respuesta inmune adquirida, donde guía y amplifica la activación celular, así como otros procesos fisiológicos y patológicos, dentro de los cuales se encuentran: la coagulación, la remoción de complejos antígeno-anticuerpo de la circulación sanguínea, la regeneración de tejidos y la inflamación (42) (43).

Para que el sistema del complemento ejerza sus funciones biológicas debe activar alguna de sus tres vías: la vía clásica, la alternativa o la vía de las lectinas. La vía alternativa y la de las lectinas participan en la inmunidad innata, mientras que la vía clásica participa en la inmunidad adquirida (32). La vía alternativa es iniciada por la hidrólisis espontánea del enlace tioéster de la molécula C3. La vía de las lectinas se activa cuando MBL o ficolinas se unen a carbohidratos que se encuentran en la superficie de los microorganismos. Mientras que la vía clásica se activa por la unión de C1q a inmunoglobulinas (IgM o IgG) unidas específicamente a antígenos, las cuales además de fijar complemento, actúan como opsoninas para la posterior eliminación de patógenos, sobre todo los isotipos IgG1 e IgG3 (IgG2a e IgG2b en ratón) para aumentar la fagocitosis de esta bacteria al interactuar con γ FcR del fagocito (34) (44).

Al iniciar el reconocimiento de antígenos específicos o de PAMP's (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) ya sea por la vía clásica y/o la de las lectinas, se activan los componentes C2 y C4, por las

proteasas de serina (C1r y C1s clásica o MASP2 lectinas) para la formación de la convertasa de C3 (C4b2a). Mientras que, en la vía alternativa, por la hidrólisis espontánea de C3, resulta en un cambio conformacional, donde el Factor B se une a C3b y enseguida, el Factor D escinde al Factor B, dando como resultado la convertasa C3(C3bBb). Las tres vías convergen en la escisión de C3, por una convertasa de C3 para generar C3a y C3b, donde el fragmento C3b se unirá covalentemente a una convertasa C3, formando la convertasa C5 (C4b2a3b o C3bBb3b) y de manera similar produce los fragmentos C5a y C5b, dando lugar al inicio de la fase terminal donde C5b actúa como núcleo para el ensamble del complejo de ataque de membrana (MAC) por la deposición de C6, C7, C8 y C9n; formando poros en la membrana, provocando el colapso de los gradientes iónicos (45), y la lisis de los patógenos (46).

Durante la activación de esta cascada enzimática ocurren los pasos críticos para que este sistema realice sus actividades opsonicas, proinflamatorias y líticas (34).

Opsonización: los fragmentos C3b, iC3b y C4b, generados por la activación enzimática, actúan como opsoninas, por su deposición en la superficie de los patógenos e interacción con receptores de complemento como CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) y CR4 (CD11c/CD18) en macrófagos y neutrófilos, facilitando la fagocitosis (42) (46) (47).

Actividad proinflamatoria: las anafilotoxinas C3a y C5a tienen como función la activación de leucocitos: macrófagos, neutrófilos, mastocitos, basófilos y eosinófilos, provocando la desgranulación y producción de citocinas que además de amplificar la inflamación al unirse a sus receptores acoplados a proteína G en mastocitos y basófilos (C3aR, C5aR o CD88), liberan aminas vasoactivas como la histamina, aumentan la permeabilidad vascular y mejoran la extravasación y quimiotaxis de neutrófilos (42) (43)

(47).

Además de la activación, C5a contribuye al reclutamiento de células NK y NKT, al sitio de infección, con el fin de interactuar con las células dendríticas que son activadas de manera sinérgica por TLR, induciendo la producción de citocinas IFN- γ y TNF- α , en casos de sepsis (48).

Lisis: el MAC es el efector lítico inmunológico de los patógenos como bacterias Gram negativas, virus envueltos y parásitos, a partir del ensamblaje secuencial de las proteínas del complemento (C5b, C6, C7, C8, C9n) el cual forma poros al insertarse en la membrana celular, que comienza a partir del ensamble de la convertasa de C5, la cual se encuentra unida covalentemente en la membrana externa del patógeno (42) (44) (45) (49).

La activación de este sistema está estrictamente controlada por varios reguladores solubles y de membrana protegiendo al huésped contra el daño celular y el consumo excesivo de sus componentes (44). Los principales reguladores solubles son el inhibidor de C1, el Factor I, el Factor H, la proteína de unión a C4b (C4BP) y la vitronectina; mientras que los reguladores de membrana son el Receptor de Complemento tipo 1 (CR1), CD59, Factor Acelerador de Decaimiento (DAF o CD55), Proteína Cofactor de Membrana (MCP o CD46) (41) (43).

Adquisición de plasminógeno del hospedero

Un mecanismo para evadir el sistema de complemento por las especies *Leptospira* spp. patógenas se da por la escisión e inactivación de moléculas claves en las tres vías del complemento, mediante la adquisición del plasminógeno del hospedero o por la actividad de

proteasas, producidas por esta bacteria (34) (40) (50).

El plasminógeno es una glicoproteína importante en el sistema fibrinolítico del hospedador que se encuentra en el plasma y los líquidos extracelulares. Una vez esta proteína es adquirida por *Leptospira* en presencia del activador tisular del plasminógeno o de uroquinasa, el plasminógeno se convierte en plasmina (activa), la cual va a escindir moléculas del complemento como C3b y C5, que dan como resultado una disminución de la opsonización, evitan la amplificación de la respuesta inflamatoria, la fagocitosis y la lisis bacteriana por el complejo de ataque de membrana (23) (34) (40).

Secreción de proteasas

Las serovariedades patógenas de *Leptospira* tienen la capacidad de producir metaloproteasas de la familia de las termolisinas, que participan en la degradación de las proteínas del complemento, como la molécula C3, la cual es el componente central de la cascada del complemento (34) (40). Además, las metaloproteasas de *Leptospira*, han sido involucradas en la degradación de péptidos antimicrobianos, como la catelicidina humana LL-37, que juegan un papel importante en la respuesta innata en humanos y animales, al inhibir el crecimiento de microorganismos en piel y mucosas evitando su diseminación (51).

Recientemente, se caracterizó la proteasa leptolisina de la familia de las pappalisinas que degrada componentes de la matriz extracelular como proteoglicanos y fibronectina. Además, in vitro la leptolisina produce un efecto citopático en células epiteliales HK-2 de túbulos proximales del riñón. Por otro lado, in vivo en la piel del ratón se observó que genera daño endotelial y focos hemorrágicos. Estos resultados sugieren que la

secreción de estas proteasas juega un papel importante en el desarrollo de la infección y las manifestaciones clínicas (52).

Reclutamiento de reguladores del Sistema de Complemento

Las serovariedades de *Leptospira* patógenas son capaces de unirse a reguladores negativos como el factor H y C4BP. El factor H, inhibe la vía alterna del sistema de complemento al evitar la unión del factor B a la molécula C3b, impidiendo la formación de la convertasa de C3 (C3bBb), así como acelerando su descomposición y actúa como cofactor del Factor I, para la escisión de C3b (34). La C4BP, inhibe la activación de la vía clásica y de las Lectinas interfiriendo con el ensamblaje de la convertasa C3, así como acelerando su desintegración y actúa como cofactor del Factor I en la inactivación proteolítica de C4b (23) (34).

Leptospira, también pueden inhibir la vía terminal del complemento al bloquear la polimerización de las moléculas de C9, al capturar la vitronectina (VN) la cual es una glicoproteína que circula en el torrente sanguíneo, y evitan la formación del MAC (23) (34) (40).

Las cepas de *Leptospira* patógenas capturan estos reguladores por medio de proteínas de la membrana externa. LenA, LenB y EF-Tu se unen al factor H; Lsa30 se une a C4BP; LigA, LigB, Lsa23, LcpA y enolasa se unen tanto al factor H como a C4BP y LcpA también se une a la vitronectina (34) (53) (54).

Proteína de unión a C4b

La proteína de unión a C4b (C4BP), es una glicoproteína plasmática de 570 kDa con una concentración sérica de $335 \pm 83 \mu\text{g/mL}$ en adultos (55)

y se encuentra en tres isoformas con diferente composición de subunidades. La isoforma principal α_7 / β_1 , es un complejo de siete cadenas α y una cadena β , mientras que las otras isoformas son α_7 / β_0 y α_6 / β_1 , que están unidas entre sí por puentes disulfuro (34) (56). La cadena α , pesa 70 kDa y la cadena β 45 kDa aproximadamente; cada cadena α contiene ocho dominios de proteínas de control del complemento (CCP), y la cadena β se compone de tres CCP (57). Los CCP son ricos en cisteína, con una longitud de 60 residuos de aminoácidos, se ha demostrado que los dominios CCP1, CCP2 y CCP3, son cruciales para su unión a C4b, como para la capacidad de regular la convertasa de C3 (56), ya que esta proteína (C4BP), inhibe la activación de la vía clásica y la de las lectinas interfiriendo con el ensamblaje y desintegración de la convertasa C3 (C4bC2a) y actúa como cofactor del Factor I en la inactivación proteolítica de C4b. Las cepas patógenas de *Leptospira* expresan proteínas de unión a C4BP como Lsa23, LigA, LigB y LcpA, que interactúan con los dominios CCP de la proteína C4BP, para evadir el sistema de complemento (23) (34) (57).

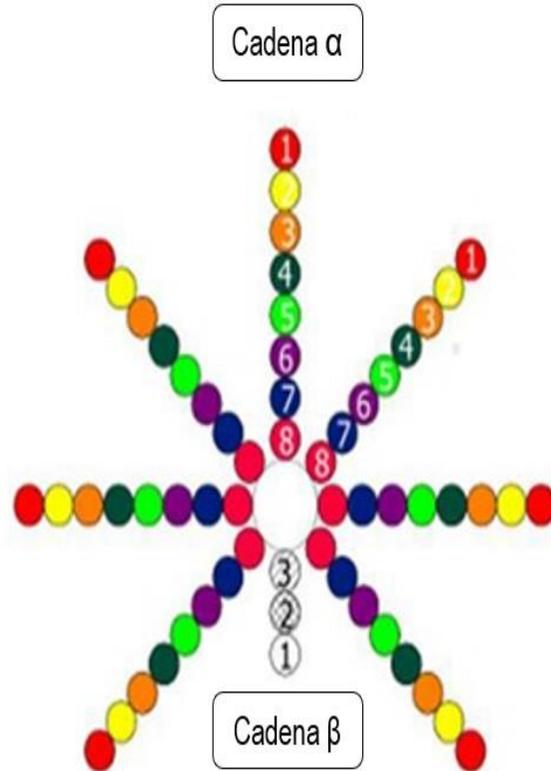


Figura 3. Estructura de C4BP. La isoforma más común de la proteína de unión a C4, tiene 7 cadenas alfa (α) y 1 cadena beta (β), α_7 / β_1 . Imagen modificada de: Breda LC, Hsieh CL, Castiblanco Valencia MM, da Silva LB, Barbosa AS, Blom AM, Chang YF, Isaac L. Fine Mapping of the Interaction between C4b-Binding Protein and Outer Membrane Proteins LigA and LigB of Pathogenic *Leptospira interrogans*. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Oct 30;9(10): e0004192 doi: 10.1371/journal.pntd.0004192 (58).

Se ha determinado que las especies patógenas de *Leptospira*, evaden al sistema del complemento por medio de la captura de reguladores del complemento solubles, utilizando proteínas de unión a estos reguladores, que expresan en su superficie (44). La captura de estos reguladores logra interrumpir la cascada de activación del complemento, de modo que se reduce la deposición de C3b en la bacteria, su opsonización y en consecuencia la fagocitosis por parte de los macrófagos (34). Además, la interrupción de la activación del complemento evita la lisis de las bacterias por el complejo de ataque de membrana (C5b6789n) y la inflamación tampoco será promovida por las anafilatoxinas (C3a y C5a) las cuales, al unirse mediante los receptores de complemento en las membranas de los mastocitos y basófilos, desencadenarían la liberación de mediadores proinflamatorios y además de que por sí mismas son quimioatrayentes para leucocitos, lo que contribuiría a aumentar la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos (44) (53).

Las serovariedades patógenas de *Leptospira*, han encontrado mecanismos para evadir la respuesta inmune de los hospederos, con el fin de evitar su eliminación y destrucción; uno de estos es la evasión del sistema de complemento, a través de la adquisición de reguladores solubles de las vías alternativa, clásica y de las lectinas, en especial el Factor H y C4BP (23).

Meri *et. al.*, en 2005 (59) demostraron a través de inmunofluorescencia indirecta, la deposición de los componentes del sistema de complemento en la superficie de *Leptospira* y realizaron una comparación cuantitativa por ELISA, observando que la molécula C3 se unía a las cepas de *Leptospira* spp., en los tres grupos que habían definido como resistentes, intermedios o susceptibles al suero humano normal. Sin embargo, observaron diferencias en la unión de C5, C6 y C8 en la superficie de

Leptospira spp., ya que en cepas patógenas (resistentes al suero) había menor deposición de estos componentes. Adicionalmente, a través de la técnica Western blot, evaluaron la capacidad de unión del regulador soluble de la vía alterna del complemento factor H, por las cepas de *Leptospira* spp. Sus resultados correlacionan la capacidad de captura del regulador soluble del complemento factor H, evidente en cepas patógenas vivas y ausente en la cepa saprofita, con la capacidad de sobrevivencia al suero humano normal (59).

Barbosa *et. al.* 2009 (23), evaluaron la sobrevivencia al suero humano normal de seis cepas, que pertenecían a cinco especies diferentes de *Leptospira* spp., clasificándolas en tres grupos distintos como Meri *et. al.* 2005 (sensibles, intermedias y resistentes), evaluaron las tres vías de activación del sistema de complemento por medio de sueros carentes de C1s y MBL, SHN y SHN inactivo donde concluyen que la vía alterna se destaca en la lisis de *Leptospira* spp. y la vía clásica contribuye parcialmente a la susceptibilidad del suero. Sin embargo, el hallazgo más importante de su estudio mostró que todas las cepas patógenas capturaron C4BP del suero humano, mientras que la cepa saprófita *L. biflexa* unió cantidades insignificantes del regulador. Ellos sugieren que las cepas patógenas atenuadas por cultivo, continúan expresando ligandos para C4BP (23).

Adicionalmente, Moreno *et. al.* 2019 (53), evaluaron la capacidad de captura del factor H, por diferentes serovariedades patógenas de *Leptospira* spp., así como entre cepas de bajo pasaje y sus correspondientes cepas atenuadas en cultivo, donde observaron que las cepas de bajo pasaje tenían mayor capacidad de capturar y una tasa más alta de sobrevivencia al suero humano normal en comparación con las cepas atenuadas en cultivo ya que estas capturaban menos factor H y sobrevivían menos en presencia de suero humano normal (53).

La captura del Factor H (FH) permite a *Leptospira* interferir con la convertasa de C3(C3bBb) de la vía alterna del complemento, debido a que este regulador tiene afinidad por C3b, bloquea la unión del Factor B al C3b evitando la formación de la convertasa, si la convertasa ya está formada, la disocia desplazando al componente Bb (34). Adicionalmente, actúa como cofactor del Factor I para la inactivación de la molécula C3b en iC3b; de manera similar ocurre con las vías clásica y de las lectinas del complemento, al capturar la proteína C4BP, *Leptospira* interfiere con el ensamblaje y la disociación de la convertasa de la vía clásica y de las lectinas (C4b2a) y actúa como cofactor del factor I para la degradación de C4b; la captura de ambos reguladores permite la interrupción de las 3 vías de activación del complemento. Como consecuencia, *Leptospira* logra eludir la fagocitosis por opsonización vía C3b/C4b, así como la lisis por la formación del complejo de ataque de membrana (MAC) además de respuesta inflamatoria promovida por las anafilotoxinas C3a y C5a (23) (53).

Vacunas

Actualmente no existe una vacuna eficaz contra *Leptospira*, debido a que la protección que confieren es limitada a serovariedades que contenga la bacterina, ya que están basadas en el LPS (60).

Estudios recientes han sugerido que las proteínas de la membrana externa de *Leptospira* spp., podrían ser alternativas interesantes para una vacuna eficaz independiente de la serovariedad, debido a su conservación entre especies y serotipos; sin embargo, se ha investigado la capacidad protectora que inducen algunas proteínas como LipL32, que es la proteína más abundante de la membrana externa, fue clonada en un vector de Adenovirus y probada como vacuna de ADN, pero mostró una protección parcial en la sobrevivencia en jerbos frente a la infección por *Leptospira*

spp. (61) (62), mientras que un estudio de proteína recombinante de LigA (rLigA) produjo protección contra la muerte y lesiones en los riñones de los hámsteres desafiados, donde sugieren que rLigA podría ser candidata para vacuna (63).

Recientemente, Ghazali *et. al.*, 2019 mostraron que las proteínas recombinantes de rLenA y rLcpA combinadas con una proteína recombinante de la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB), estimularon la respuesta inmune mediada por células Th1, ya que la medición de INF- γ de los hámsteres fue mayor en comparación con la medida de la producción de IL-4 e IL-17, sin embargo, mostraron una menor protección al compararlas con los estudios realizados con las proteínas Lig, pero sugieren que rLenA y rLcpA podrían ser usadas como candidatas para vacuna (64).

Justificación

Previamente se investigó la capacidad de captura del regulador Factor H, por diferentes serovariedades patógenas de *Leptospira* spp, así como entre cepas de *Leptospira* spp. de bajo pasaje y atenuadas por pases en cultivo (alto pasaje), y se observaron diferencias en la capacidad de captura del regulador, así como una correlación positiva con la sobrevivencia al suero normal (53). Sin embargo, se sabe que *Leptospira* captura otros reguladores del complemento además del Factor H, por lo que también podrían contribuir a su sobrevivencia. La proteína de unión a C4b (C4BP) es un regulador soluble que actúa a nivel de la convertasa de C3 de las vías clásica y de las lectinas (34). Es relevante caracterizar la contribución de esta proteína al proceso de evasión inmune por *Leptospira*, ya que estos resultados adicionales a los obtenidos previamente de captura del Factor H, darían oportunidad de entender mejor el proceso de evasión del sistema del complemento que determina la sobrevivencia de las cepas de *Leptospira* spp. al suero. Adicionalmente, las proteínas que contribuyen al mecanismo de evasión podrían ser candidatos interesantes para el desarrollo de una vacuna capaz de inducir inmunoprotección de manera independiente de la serovariedad.

Hipótesis

Las cepas de bajo pasaje de *Leptospira* spp., mostrarán una mayor capacidad paracapturar el regulador soluble del complemento C4BP, en comparación con las cepas atenuadas por pasaje en cultivo (alto pasaje). Los datos de captura correlacionarán positivamente con los datos de sobrevivencia de las cepas en presencia de suero.

Objetivos

Objetivo general

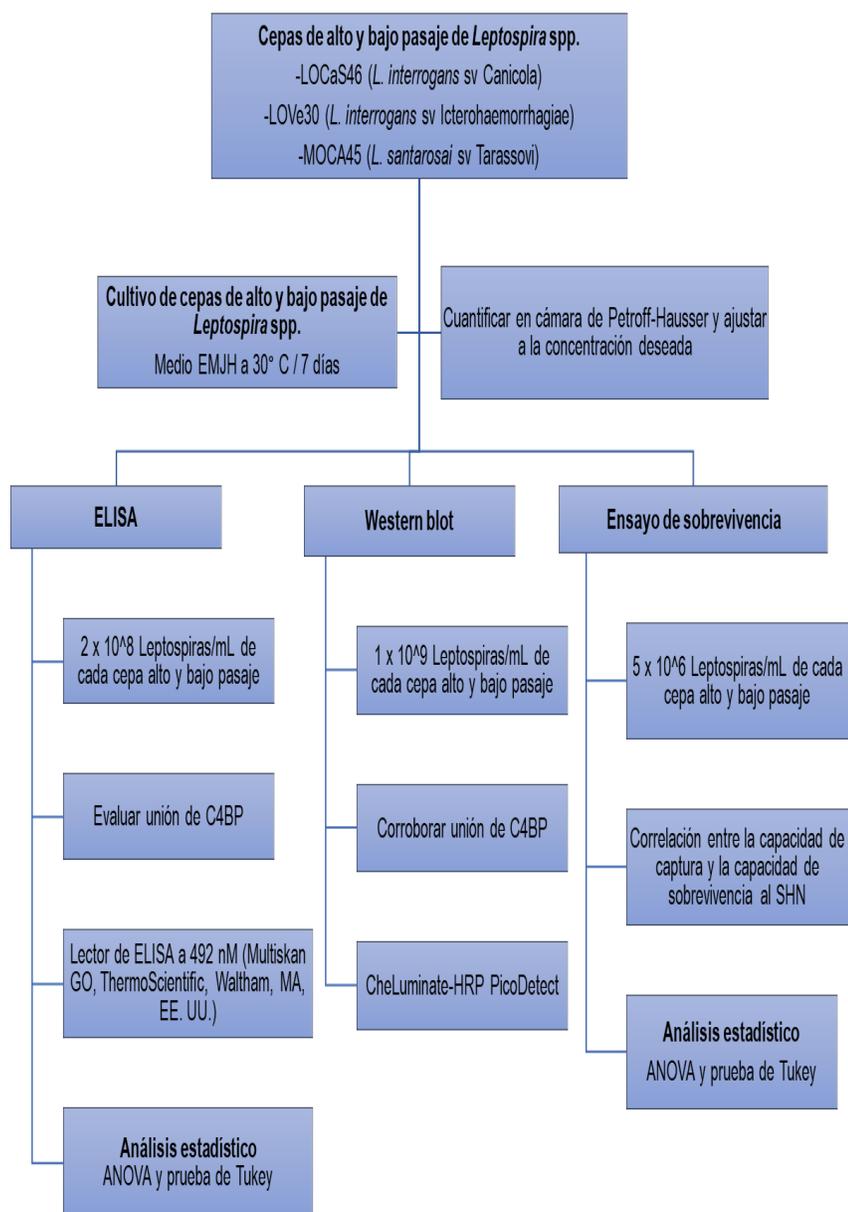
Determinar si existen diferencias en la capacidad de captura del regulador del complemento C4BP entre cepas patógenas de bajo pasaje y atenuadas por pases en cultivo (alto pasaje) de diferentes especies de *Leptospira*, así como su relación con la sobrevivencia en presencia de suero normal.

Objetivos específicos

- Establecer si existen diferencias en la capacidad de captura del regulador C4BP entre cepas de bajo pasaje y atenuadas por pases en cultivo (alto pasaje) de *Leptospira* spp.
- Evaluar si las diferencias en la capacidad de captura de C4BP, determinan diferencias en la sobrevivencia de *Leptospira* spp.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Cuadro 1. Flujograma de trabajo



Suero Humano Normal (SHN)

Se obtuvieron muestras de sangre en tubos sin anticoagulante de donantes voluntarios sanos, con previo consentimiento informado. Las muestras de sangre se dejaron coagular a 4°C. Se centrifugó a 2,332 xg, durante 8 minutos. Se realizó un pool con los sueros y se realizaron alícuotas de 600 µL y se congelaron a -80°C hasta su uso.

Cultivo de *Leptospira* spp.

Se utilizaron las cepas patógenas de *Leptospira* de bajo pasaje: LOCaS46 (*Leptospira interrogans* sv Canicola) (DL50h = 4), LOVe30 (*L. interrogans* sv Icterohaemorrhagiae) (DL50h = 40) y MOCA45 (*L. santarosai* sv Tarassovi) (DL50h > 40,000) y sus correspondientes y atenuadas por alto pasaje en cultivo (Cuadro 2). Todas las cepas se cultivaron en medio Ellinghausen y McCullough, modificado por Johnson y Harris (EMJH) durante siete días a 30° C antes de su uso (53).

Cuadro 2. Cepas utilizadas

Especie	Serovariedad	Cepas BP	Cepas AP
<i>L. interrogans</i>	Canicola	LOCaS46	LOCaS46
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	LOVe30	LOVe30
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	MOCA45	MOCA45
<i>Leptospira biflexa</i>	Patoc		Patoc I

BP= bajo pasaje AP= atenuadas (alto pasaje)

Ensayo de captura de C4BP por *Leptospira* (ELISA)

Con el fin de evaluar la capacidad de captura de C4BP por *Leptospira* spp., se usaron placas de microtitulación de alta unión. Primero se realizó el conteo de *Leptospira* spp. en cámara de Petroff-Hausser (Hausser Scientific, Horsham, PA, EE. UU.) y se ajustó el número de bacterias a 2×10^8 células. Los cultivos fueron lavados con PBS pH 7.4 a 1 M de (NaCl, KCl, Na_2HPO_4 y KH_2HPO_4) centrifugando a 11,600 xg por 25 min a 21°C. Las cepas LOCaS46 (*L. interrogans* sv Canicola), LOVe30 (*L. interrogans* sv Icterohaemorrhagiae) y MOCA45 (*L. santarosai* sv Tarassovi) de bajo y alto pasaje y la cepa saprofita Patoc I *Leptospira biflexa* sv Patoc, fueron incubadas con 40% de suero humano normal (SHN) como fuente de C4BP en PBS con un volumen final de 200 μL , durante 15 min a 37°C; la actividad del complemento fue detenida en hielo por 1 min. Posteriormente las suspensiones bacterianas fueron lavadas 3 veces con 500 μL de PBS pH 7.4, centrifugando a 11,600 xg por 10 min a 10°C, decantando el sobrenadante y homogenizando en un agitador de vórtice. El sedimento fue suspendido en solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 100mM pH 9.6 en un volumen final de 200 μL , fijando las células por duplicado en la placa de ELISA donde cada pozo se recubrió con 1×10^8 células a 4°C, 16 h. Las placas se bloquearon con 200 μL /pozo con BSA 3% en PBS -T pH 7,4 (PBS pH 7,4 + Tween 20 al 0,05 %) por 1 h a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-T entre cada paso. El C4BP unido a *Leptospira* spp., se detectó con anticuerpos monoclonales de ratón anti-C4BP humano [1:8000, 100 μL /pozo, 1 h a 37°C; (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts (EE. UU.))]; seguido de anticuerpos policlonales de cabra conjugados con peroxidasa anti- ratón IgG2b [1:10000, 100 μL /pozo, 1 h a 37°C; (ABcam, Cambridge, Reino Unido)]. La reacción del sustrato se realizó con un comprimido de 5 mg de OPD (diclorhidrato de 1,2-orto-fenilendiamina, Thermo Fischer Scientific Inc.

Waltham, Massachusetts (EE. UU.) y 5 μL de H_2O_2 al 30 % en 5 mL de tampón citrato-fosfato pH 5.0. La reacción se detuvo con H_2SO_4 4 N (50 μL /pocillo). Luego la placa fue leída por el lector de ELISA a 492 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Los datos se graficaron en Graph Pad Prism 8 (23) (53).

Ensayo de sobrevivencia

Se utilizó el protocolo descrito por Meri *et al.*, 2005 y modificado por Barbosa *et al.*, 2009. Todas las cepas (bajo pasaje y su respectiva atenuada en cultivo) fueron cuantificadas en cámara de Petroff-Hausser (Hausser Scientific, Horsham, PA, EE. UU.), en un microscopio de campo oscuro y ajustadas a una concentración de 5×10^6 leptospiras/mL. Se centrifugaron a 11,600 xg, 20 min, 20°C para retirar el medio EMJH, luego se resuspendió la pastilla en 200 μL , con 40% de SHN en PBS (80 μL SHN + 120 μL PBS), se incubó a 120 rpm, a 37°C durante 1 hora. Con el fin de detener la actividad del complemento se incubaron en hielo durante 1 min; se realizó una dilución 1:10 donde se colocó 180 μL de EMJH modificado en una placa de cultivo de 96 pozos estéril con tapa y se colocó 20 μL , de cada suspensión bacteriana. Se incubó durante 4 días a 30°C. Finalmente se cuantificó el desarrollo bacteriano por medio de una cámara de Petroff-Hausser en campo oscuro. Como control se realizó el mismo procedimiento con cada una de las cepas de *Leptospira* spp. (bajo y alto pasaje) en 40% de Suero Humano Normal Inactivado (SHN-I) por calor (56°C, 30 min) en PBS. Se realizaron tres ensayos independientes, cada uno de los ensayos de sobrevivencia se realizaron por triplicado (23) (59).

Captura de C4BP por *Leptospira* spp vivas de bajo pasaje y atenuadas

Los cultivos de *Leptospira* spp. (1×10^9) se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con 40% de NHS con 10 mM EDTA, 15 min a 37°C. Después de cinco lavados con PBS, se tomó 20 µl de la última fracción de lavado. Seguido, las proteínas unidas a las leptospiras fueron disociadas con 100 µl de 0.1 M glicina-HCl (pH 2.0), durante 5 minutos después de centrifugar se agregó 10 µl de 1 M Tris-HCl (pH 8.0) al sobrenadante para neutralizarlo. Enseguida, 20 µl de sobrenadante se separó por electroforesis en gel al 10% de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras, y se transfirió a membranas de nitrocelulosa. Los sitios de unión inespecíficos en la membrana se bloquearon (10% leche baja en grasa/PBS-T, 16 h a 4°C). Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces (PBS-T 5 min, TA), y se incubaron (1 h, TA) con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-C4BP humano [dilución 1: 4000 en PBS-T-1% leche descremada, 60 rpm, 37°C a TA, 1 h [(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, EE. UU.)]. Después de tres lavados con PBS-T, las membranas se incubaron con Anti-IgG2b de ratón policlonal de cabra conjugado con peroxidasa [dilución 1: 10,000 en PBS-T-1% leche, a TA, 1 h (ABcam, Cambridge, Reino Unido)]. Después de cinco lavados con PBS-T, la señal se detectó con CheLuminate-HRP PicoDetect (23) (53).

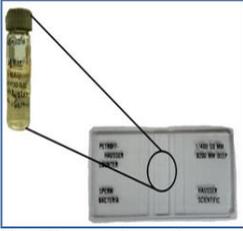
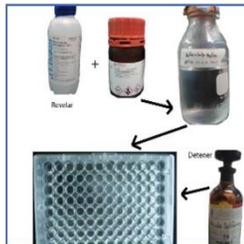
Correlación entre la capacidad de captura de C4BP y sobrevivencia frente al 40% SHN

Los datos obtenidos de captura de C4BP (D.O. 492 nm), fueron convertidos en porcentaje, tomando el 100% la cantidad de C4BP, presente en 40% de SHN y junto con los porcentajes de sobrevivencia fueron transformados a su respectivo arcoseno para ser analizados mediante regresión lineal y determinar si existe correlación entre la capacidad de captura del regulador y la capacidad de sobrevivencia al SHN.

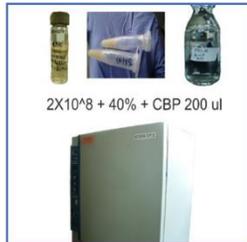
Análisis estadístico

Los resultados de captura de C4BP obtenidos por ELISA y del ensayo de sobrevivencia de *Leptospira* spp., fueron evaluados con análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre las serovariedades patógenas de *Leptospira* spp., de bajo pasaje y atenuada en cultivo. Se determinó la existencia de una relación lineal (regresión) entre la capacidad de captura y la capacidad de sobrevivencia al suero humano normal. Se utilizó el software Graphpad Prism 8® para todos los análisis (Graphpad Software, Inc, CA, EE. UU.).

Cuadro 3. Pasos de la metodología

<p>Paso 1</p>  <p>Cultivo de cepas de <i>Leptospira</i> spp. de alto y bajo pasaje en medio EMJH a 30° C / 7 días</p> <ul style="list-style-type: none"> • LOCaS46 (<i>L. interrogans</i> sv Canicola) • LOVe30 (<i>L. interrogans</i> sv Icterohaemorrhagiae) • MOCA45 (<i>L. santarosai</i> sv Tarassovi) • Cepa saprofita Patoc I <i>Leptospira biflexa</i> sv Patoc 	<p>Paso 2</p>  <p>Cuantificar en cámara de Petroff-Hausser y ajustar a 2×10^8 Leptospiras/mL</p> <p>-Se cuantificó cada cepa de <i>Leptospira</i> spp. de alto y bajo pasaje y la cepa saprofita</p>	<p>Paso 3</p>  <p>Incubación de suspensiones bacterianas con 40% de SHN</p> <p>-Se centrifugaron los cultivos a $11.600 \times g$, 25 min a 21° C</p> <p>-Se lavó 1 vez con PBS pH 7,4</p> <p>-La incubación fue con 40% de suero humano normal en PBS, 15 min a 37° C</p> <p>-Se detuvo la actividad del complemento en hielo por 1 min.</p>	<p>Paso 4</p>  <p>Preparación de la placa de micro titulación de ELISA</p> <p>-Las cepas se lavaron con PBS pH 7,4 3 veces $11.600 \times g$, 10 min a 10° C</p> <p>-Cada pozo se recubrió con 1×10^8 células de las cepas de <i>Leptospira</i> spp., en solución de carbonato de sodio a 4° C, 16 h.</p>
<p>Paso 5</p>  <p>Bloquear la placa con BSA 3%</p> <p>-Se adicionó 200 μL a cada pozo BSA 3% en PBS y se incubó por 1 h a 37° C</p>	<p>Paso 6</p>  <p>Agregar anticuerpos primario y secundario</p> <p>-Las placas fueron lavadas 3 veces con PBS</p> <p>-La detección de C4BP unido a <i>Leptospira</i> spp., fue mediante anticuerpos monoclonales de ratón anti-C4BP humano</p> <p>-La reacción fue visible mediante anticuerpos policlonales de cabra conjugados con peroxidasa anti-ratón IgG2b</p>	<p>Paso 7</p>  <p>Revelado</p> <p>-La reacción del sustrato se realizó con comprimidos de 0.5-1.0 mg/mL de OPD (diclorhidrato de 1,2-orto-fenilendiamina, ThermoFischer Scientific Inc. Waltham, Massachusetts (EE. UU.) y 5 μL de H₂O₂ al 30 % en 5 mL de tampón citrato-fosfato pH 5.0.</p> <p>-Se detuvo la reacción con H₂SO₄ 4 N (50 μL/pocillo)</p>	<p>Paso 8</p> 

Paso 9

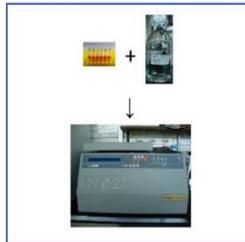


2X10⁸ + 40% + CBP 200 ul

Western blot

- A partir de los cultivos de *Leptospira* spp. (1 x 10⁹), se lavaron 3 veces con PBS pH 7,3
- Se incubó a 37°C por 15 minutos las *Leptospiras* + NHS 40% + EDTA 10 mM.

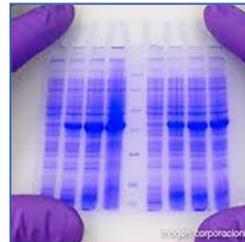
Paso 10



Disociación de proteínas unidas a *Leptospira* spp.

- Las cepas fueron lavadas 3 veces con PBS
- Se disociaron las proteínas unidas a las leptospiras con 100 µl de 0.1 M glicina-HCl (pH 2.0)
- Se centrifugó y se agregó 10 µl de 1 M TRIS-HCl (pH 8.0) al sobrenadante para neutralizar

Paso 11



Electroforesis

- 20 µl del sobrenadante se separará por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con SDS, en condiciones no reductoras

Paso 12



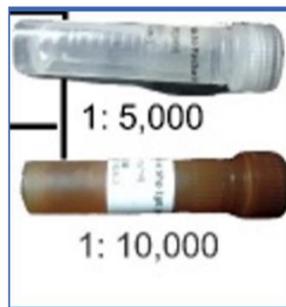
Paso 13



Bloquear la membrana

- Se bloquearon los sitios de unión inespecíficos en la membrana con 10% leche baja en grasa/PBS-T
- La membrana fue incubada a temperatura ambiente, por 1 h.

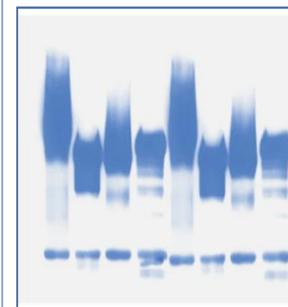
Paso 14



Agregar anticuerpos primario y secundario

- Se lavó la membrana 3 veces con PBS por 5 min
- Se incubó con un anticuerpo monoclonal de ratón IgG2b anti-C4BP humano a temperatura ambiente por 1 h.
- La membrana se lavó 3 veces con PBS
- Las membranas se incubaron con IgG policlonal anti-ratón IgG2b de cabra conjugado con peroxidasa

Paso 15



Detección

- Después de lavar exhaustivamente la membrana, la señal se detectó con CheLuminate-HRP PicoDetect

III. RESULTADOS

Captura de C4BP por sv de *Leptospira* spp. de bajo pasaje y atenuadas mediante ELISA

Los resultados muestran que todas las serovariedades de *Leptospira* spp. capturan al regulador C4BP con respecto a su control (sin suero), el control positivo fue SHN 40% (C4BP, presente en 40% de suero) en el ELISA.

Leptospira interrogans sv. Canicola cepa LOCaS46 de bajo pasaje, captura más C4BP frente a su homóloga atenuada en cultivo; de manera similar, *L. interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30 de bajo pasaje capturó más C4BP en comparación con su homóloga atenuada y finalmente, *L. santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 de bajo pasaje capturó más C4BP frente a su homóloga atenuada. La diferencia en la capacidad de captura de C4BP entre cada cepa patógena de bajo pasaje y su homóloga atenuada mostraron una $P < 0.0001$ (Fig. 4).

Adicionalmente, entre las serovariedades patógenas de *Leptospira interrogans* sv. Canicola e Icterohaemorrhagiae de bajo pasaje no mostraron diferencia estadísticamente significativa en captura de C4BP, de la misma manera, entre sus respectivas atenuadas en cultivo no se observó diferencia. Sin embargo, entre especies si existe diferencia en la capacidad de captura del regulador C4BP, en las cepas de bajo pasaje: *Leptospira interrogans* sv. Canicola cepa LOCaS46 captura más C4BP que *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 ($P < 0.005$), de la misma manera *Leptospira interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30 captura más C4BP que *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 ($P < 0.005$). Finalmente, entre especies atenuadas en cultivo *Leptospira interrogans* sv.

Canicola cepa LOCaS46 captura más que *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 ($P = 0.01$) y *Leptospira interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30 captura más C4BP frente a *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 ($P < 0.0001$).

Como se esperaba, la cepa saprofita Patoc I de *Leptospira biflexa* sv Patoc, captura menos C4BP, en comparación a las serovariedades patógenas de bajo pasaje, *Leptospira interrogans* sv. Canicola cepa LOCaS46, *Leptospira interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30 y *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 (todas con una $P < 0.0001$, datos no mostrados); sin embargo, al comparar la capacidad de captura con las serovariedades atenuadas en cultivo, se obtuvieron diferentes resultados: *Leptospira interrogans* sv. Canicola cepa LOCaS46 y *Leptospira interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30 capturan más que *Leptospira biflexa* sv Patoc cepa Patoc I ($P = 0.01$) ($P < 0.0001$), pero al compararla con *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45, no hay diferencia significativa (Datos no mostrados).

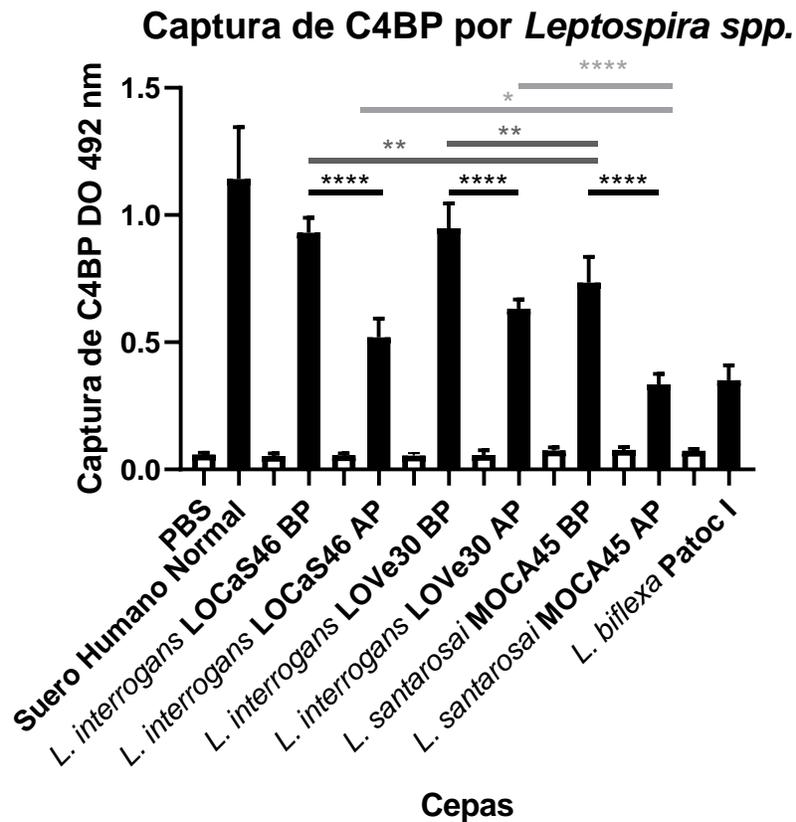


Figura 4. Captura de C4BP por *Leptospira* spp., de bajo pasaje y sus respectivas cepas atenuadas por cultivo. Aproximadamente 2×10^8 células de *Leptospira interrogans* sv. Canicola cepa LOCaS46, *Leptospira interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30 y *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 de bajo pasaje (BP), además de sus respectivas homologas atenuadas (AP) y *Leptospira biflexa* sv. Patoc cepa Patoc I, fueron expuestas al 40% de suero humano normal (SHN), lavadas exhaustivamente y fijadas en una placa de ELISA por duplicado (1×10^8 /pozo). En los controles negativos (barras blancas), las bacterias fueron expuestas a PBS en lugar de SHN y el control positivo fue 40% SHN (C4BP). Después del bloqueo, la placa fue incubada con anticuerpo monoclonal IgG2b de ratón anti-C4BP humano 1:8.000 (Invitrogen, ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts (EE. UU.)), seguido de un anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa de rábano picante de cabra anti-IgG2b de ratón 1:10.000 (ABcam, Cambridge, Reino Unido). $P < 0.05$, * $P < 0.005$, ** $P < 0.0001$ ****. La figura muestra las medias de cuatro repeticiones independientes y cada experimento se realizó por duplicado.

Sobrevivencia de serovariedades de *Leptospira* spp. de bajo pasaje y atenuadas en 40% de SHN

Todas las cepas patógenas tuvieron la capacidad de sobrevivir a la exposición del suero humano normal al 40% (SHN 40%), se consideró como el 100% de sobrevivencia al número leptospiras vivas de cada una de las cepas expuestas al 40% de suero humano normal inactivado por calor (Fig. 5).

Leptospira interrogans sv. Canicola cepa LOCaS46 de bajo pasaje (BP), sobrevivió 52%, mientras que su atenuada (AP) sobrevivió 34%; *Leptospira interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30 BP sobrevivió 48% y su atenuada tuvo una sobrevivencia de 3% y finalmente *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 de bajo pasaje sobrevivió 31% y su homóloga atenuada 12%, la diferencia en la capacidad de sobrevivencia de cada cepa patógena de bajo pasaje y su homóloga atenuada mostraron una $P < 0.0001$.

Entre serovariedades de *Leptospira interrogans*, no hay diferencia estadísticamente significativa en la capacidad de sobrevivencia al SHN entre las cepas de bajo pasaje, mientras que entre las cepas atenuadas si la hubo, la cepa LOCaS46 sobrevive más frente a LOVe30 $P < 0.0001$.

Sin embargo, entre especies, *L. interrogans* sv. Canicola cepa LOCas46 y sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30, mostraron mayor capacidad de sobrevivencia que *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 de bajo pasaje ($P < 0.0001$) y entre las cepas atenuadas en cultivo *L. interrogans* sv. Canicola cepa LOCas46 y *L. santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 sobreviven más que *Leptospira interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30 ($P < 0.0001$ y $P < 0.05$ respectivamente).

Sobrevivencia de *Leptospira* spp.

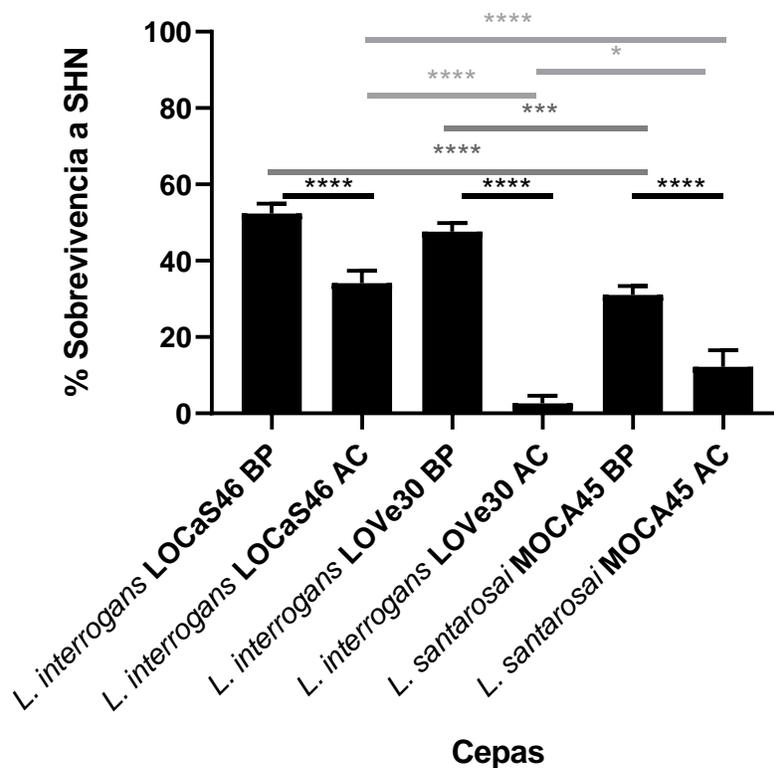


Figura 5. Porcentaje de sobrevivencia en serovariedades de *Leptospira* spp. de bajo y alto pasaje. Se usaron 5×10^6 de *Leptospira interrogans* sv. Canicola cepa LOCaS46, *Leptospira interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30 y *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 de bajo pasaje (BP) y sus respectivas cepas homólogas atenuadas por cultivo o alto pasaje (AP), fueron expuestas durante 1 hora a 37°C a SHN 40% y a suero humano normal previamente inactivado por calor [SHN-I 40% (56°C durante 30 min)], enseguida se realizó una dilución 1:10, colocando 180 μ L de EMHJ modificado, en una placa estéril de 96 pozos y 20 μ L de cada suspensión bacteriana expuesta a SHN 40% y SHN-I 40%, se incubó durante 4 días a 30°C y finalmente se cuantificó por cámara de Petroff-Hausser, en microscopía de campo oscuro. $P < 0.05$ * $P < 0.0001$ ****. Se consideró como 100% de sobrevivencia al número de leptospiras vivas de cada una de las cepas después de exponerlas al SHN-I. La figura muestra las medias de los porcentajes de sobrevivencia de tres repeticiones independientes y cada experimento se realizó por triplicado.

Correlación entre la capacidad de captura de C4BP y la capacidad de sobrevivencia en 40% de SHN

Los datos obtenidos de la capacidad de captura de C4BP en D.O. 492 nm, mediante el ensayo de ELISA, fueron convertidos en porcentaje tomando como 100% las absorbancias obtenidas de C4BP, presente en 40% de SHN (Control positivo).

Los porcentajes de la capacidad de sobrevivencia fueron obtenidos en el ensayo de sobrevivencia al 40% de SHN, tomando como 100% el desarrollo bacteriano de las serovariedades de *Leptospira* spp., en 40% de SHN-I.

Los datos obtenidos en porcentajes, fueron convertidos a su respectivo arcoseno para realizar una correlación entre la capacidad de captura de C4BP y la capacidad de sobrevivencia frente al 40% SHN, fueron graficados utilizando una regresión lineal, obteniendo un valor de $R^2 = 0.7119$, que es el coeficiente de determinación, indicando que existe una correlación positiva, entre la capacidad de captura de C4BP y la capacidad de sobrevivencia al suero, al ser cercano a 1.

Correlación entre Captura y Supervivencia

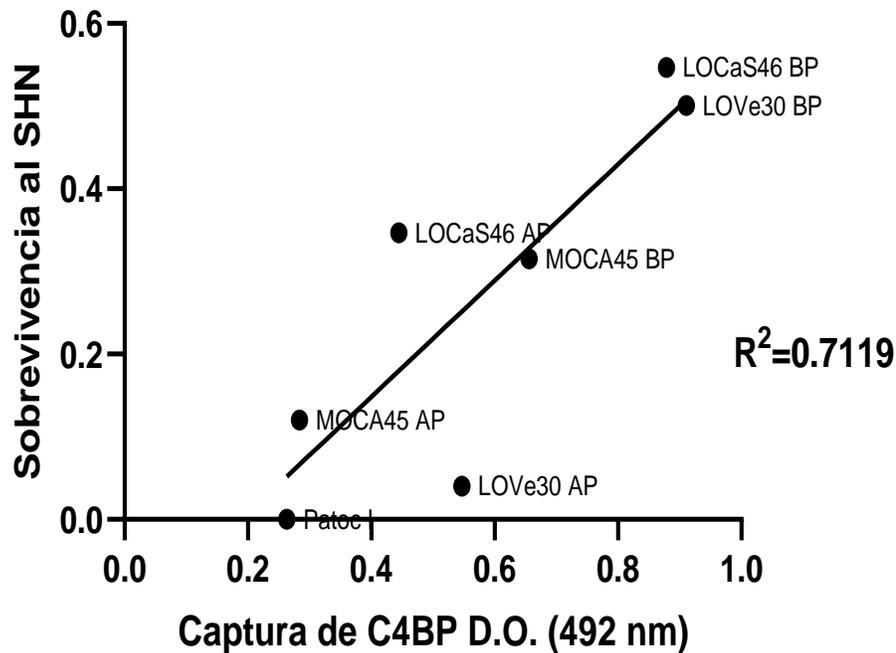


Figura 6. Correlación entre la capacidad de captura de C4BP y la capacidad de supervivencia frente al suero humano normal de cepas de bajo pasaje de *Leptospira* spp y sus homólogas atenuadas. Los resultados obtenidos de captura de C4BP fueron convertidos en porcentaje, considerando el 100% el valor de C4BP, presente en el suero (D.O. 492 nm) y el porcentaje obtenido de la supervivencia, el cual se consideró el 100% al desarrollo en SHN inactivado, de *Leptospira interrogans* sv. Canicola cepa LOCaS46, *Leptospira interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30 y *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 de bajo pasaje (BP) y sus respectivas homólogas de alto pasaje (AP), y *Leptospira biflexa* sv. Patoc cepa Patoc I. Cada porcentaje obtenido fue convertido a su respectivo arcoseno; todos los datos fueron correlacionados por regresión lineal. El valor de R^2 indica que existe correlación entre la capacidad de captura de C4BP y la capacidad de supervivencia si es próximo a 1, así como la proximidad de los puntos a la recta de ajuste.

Captura de C4BP por serovariedades de *Leptospira* spp. vivas de bajo y alto pasaje mediante la técnica de Western blot

Con el fin de corroborar cualitativamente la capacidad de captura de la proteína de unión a C4, por serovariedades patógenas de *Leptospira* spp. vivas, se incubaron con SHN como fuente de C4BP, el cual fue eluido con glicina ácida y analizado en condiciones no reductoras en SDS-PAGE 10% y Western blot, en el gel se colocó el eluido de cada serovariedad patógena de *Leptospira* spp. de bajo pasaje y su respectiva homóloga atenuada en cultivo (AP) y la última fracción de lavado, un gel fue teñido con azul de Coomassie y el segundo fue transferido a una membrana de nitrocelulosa, para la detección del C4BP capturado.

Los resultados obtenidos, permite la observación de la diferencia de la capacidad de captura de C4BP en 40% de SHN, entre cepas de bajo pasaje y atenuadas en cultivo (Fig.7).

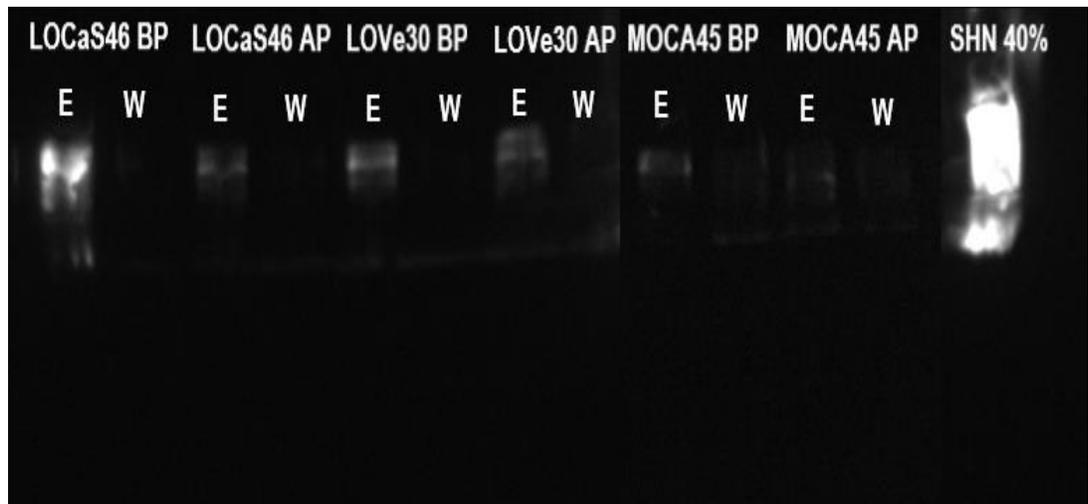


Figura 7. Captura de C4BP por *Leptospira* spp. vivas, de bajo pasaje y sus respectivas cepas atenuadas por cultivo por Western blot. Se colocaron 1×10^9 de *Leptospira interrogans* sv. Canicola cepa LOCaS46, *Leptospira interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30 y *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 de bajo pasaje (BP) y sus respectivas homologas de alto pasaje (AP), las cuales fueron expuestas al 40% de suero humano normal (SHN) y lavadas exhaustivamente, luego las proteínas adsorbidas fueron eluidas con glicina-HCl pH 2.0 y neutralizadas con Tris-HCl pH 8.0, después se separaron por SDS-PAGE 10%, luego estas proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Después del bloqueo, se adicionó el anticuerpo monoclonal IgG2b de ratón anti-C4BP humano (1:4000) (Invitrogen, ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, EE. UU.) y anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa de rábano picante de cabra anti-IgG2b de ratón 1:10.000 (ABcam, Cambridge, Reino Unido); E: fracciones eluidas W: última fracción de lavado antes de la elución.

IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se ha demostrado que varias bacterias como: *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *E. coli*, *Streptococcus* spp., *Neisseria* spp., algunas espiroquetas de los géneros *Borrelia* spp., *Treponema* spp. y *Leptospira* spp., han desarrollado diferentes mecanismos para evadir la respuesta inmune, dentro de los cuales pueden capturar reguladores del sistema de complemento, a través de proteínas de superficie y lograr su diseminación en órganos blanco (65) (66) (67) (68) (69).

Las serovariedades patógenas de *Leptospira* spp., capturan reguladores solubles de las diferentes vías del sistema de complemento como el FH, C4BP y vitronectina. La proteína de unión a C4 (C4BP), es un regulador soluble de la vía clásica y de las lectinas a nivel de la convertasa de C3 (C4bC2a), al impedir su formación o disociarla una vez formada, además actúa de cofactor del FI para la escisión de C4b (56).

En esta investigación corroboramos de manera cuantitativa y cualitativa, que las serovariedades patógenas de *Leptospira* spp., se unen el regulador soluble C4BP, por lo que es posible que interfiera a nivel de la convertasa C3 en la vía clásica y de las lectinas. Los resultados obtenidos demuestran diferencias en la capacidad de captura entre las cepas de *Leptospira* spp., (LOCaS46, LOVe30 y MOCA45) de bajo pasaje (LP) o virulentas y de alto pasaje o atenuadas por cultivo.

Las tres cepas (LOCaS46, LOVe30 y MOCA45) de bajo pasaje mostraron una mayor unión a C4BP en comparación con sus respectivas cepas atenuadas (alto pasaje) tanto en ELISA como en Western blot; y la cepa de referencia de alto pasaje saprófita *Leptospira biflexa* sv Patoc cepa Patoc I

que capturó menor cantidad de C4BP, resultados que se esperaban ya que se ha demostrado que las serovariedades patógenas de *Leptospira* spp., son capaces de unirse a reguladores del sistema de complemento para evadir la respuesta inmune del hospedador, mientras que las serovariedades saprófitas son sensibles al efecto del complemento (23) (44), estos datos de captura son consistentes con los que obtuvo Barbosa *et. al.*, 2009, mediante la técnica de Western blot, observando de manera cualitativa que todas las cepas capturan C4BP y además que existen diferencias en la capacidad de captura entre especies patógenas de *Leptospira* spp., mientras que la cepa saprófita Patoc I, captura menor cantidad del regulador soluble de la vía clásica y de las lectinas (23).

En este estudio se encontró que, entre las serovariedades Canicola e Icterohaemorrhagiae de *Leptospira interrogans* de bajo pasaje no hay diferencias en la capacidad de captura del regulador soluble C4BP, de manera similar, en la investigación de Moreno *et. al.* 2019, estas serovariedades tampoco presentaron diferencia en capacidad de captura con el regulador soluble de la vía alterna FH; entre las cepas atenuadas en cultivo, tampoco existe diferencia en capacidad de captura de C4BP, sin embargo, Moreno *et. al.* 2019, encontró que las cepas atenuadas LOCaS46 captura más FH, que LOVe30 (53). En contraste, entre especies de bajo pasaje, si existe diferencia, ya que *Leptospira interrogans* sv. Canicola cepa LOCaS46 captura más que *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45, de la misma manera *Leptospira interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30 captura más C4BP frente a *L. santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 y entre especies atenuadas en cultivo o alto pasaje, *L. interrogans* sv. Canicola cepa LOCaS46 y *L. interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30 capturan más que a *L. santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45, estos resultados difieren con lo encontrado por Moreno *et. al.*, 2019, ya que ellos encontraron que la cepa MOCA45 de bajo y alto pasaje, capturan más FH tanto en ELISA

como en Western blot, que LOCaS46 y LOVe30 tanto de bajo pasaje como atenuada en cultivo (53).

De manera similar ocurrió en los ensayos de sobrevivencia, todas las cepas fueron capaces de sobrevivir al efecto del suero, pero la capacidad de sobrevivencia entre cepas de bajo pasaje y sus respectivas atenuadas en cultivo tuvieron diferencias estadísticamente significativas; entre serovariedades patógenas de las cepas de bajo pasaje de *Leptospira interrogans*, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa, pero entre las atenuadas en cultivo si existe diferencia en la capacidad de sobrevivencia, la cepa LOCaS46 sobrevivió más frente a LOVe30, estos resultados son consistentes con los de Moreno *et. al.*, 2019 (53).

En contraste, entre especies de *L. interrogans* sv. Canicola cepa LOCas46 y sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30, significativamente tienen mayor capacidad de sobrevivir que *Leptospira santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 de bajo pasaje; mientras que entre las cepas atenuadas en cultivo *L. interrogans* sv. Canicola cepa LOCas46 y *L. santarosai* sv. Tarassovi cepa MOCA45 sobreviven más que *Leptospira interrogans* sv. Icterohaemorrhagiae cepa LOVe30 y finalmente *L. biflexa* serovariedad Patoc, cepa Patoc I, no sobrevivió al efecto del suero, en diversos estudios, ya se ha demostrado que las cepas saprófitas son sensibles al efecto del suero (23) (53) (59).

Un hallazgo interesante dentro de nuestro estudio fue que MOCA45, mostró diferencias estadísticamente significativas tanto en la unión con C4BP (ELISA y Western blot), como en la capacidad de sobrevivir frente al SHN, en contraste con los hallazgos de Moreno *et. al.* 2019 donde no encontró diferencia significativa en la captura del regulador Factor H y en el porcentaje de sobrevivencia entre las cepas MOCA45 de BP y AP (53), esto podría

deberse a que la cepa atenuada por cultivo se encuentra en un pase mayor a 113 y cuando se realizaron los experimentos con factor H en 2019, la cepa se encontraba en un pase alto N° 20 (53), estos datos encontrados refuerzan la información encontrada por Meri *et. al.* 2005 (59) ya que ellos usaron una cepa con 10 pases (el cual no es un número de pase alto) después de aislarla en un paciente, observaron que esta cepa parecía tener resistencia frente a la actividad del suero, sugiriendo que los factores o propiedades que le confieren a las cepas la resistencia sérica, se mantienen en condiciones de cultivo después de varios pases (23) (59).

Los ensayos de sobrevivencia realizados por Barbosa *et. al.*, 2009, sugieren que la vía clásica contribuye a la muerte de cepas con patogenicidad intermedia, al incubar a *Leptospira interrogans* serovariedad Pomona con suero deficiente en C1s, observó una diferencia significativa en la sobrevivencia al incubar con SHN, pero no con el SHN-I, datos que confirman el efecto observado en la cepa *Leptospira santarosai* serovariedad Tarassovi, cepa MOCA45 (23), mientras que varios autores han sugerido que la vía alterna tiene un papel importante en la lisis de leptospiras saprófitas (23) (70) (71).

Adicionalmente, los ensayos de sobrevivencia realizados por Meri *et. al.*, 2005, Barbosa *et. al.*, 2009 con cepas consideradas como sensibles, intermedias y resistentes a la actividad lítica del suero; y las cepas usadas por Moreno *et. al.*, 2019, las cuales son las mismas cepas empleadas en este estudio son consistentes, ya que las cepas de bajo pasaje virulentas por pasaje en hámsteres, tuvieron mayor tasa de sobrevivencia en comparación con sus correspondientes cepas atenuadas en cultivo y con la cepa saprófita Patoc I (23) (53) (59).

Algunos autores han demostrado que, con la captura de los reguladores, se logra interrumpir la cascada del complemento; Meri *et. al.*, 2005 (59), Barbosa *et al.*, 2009 (23) y Alves da Silva *et. al.*, 2020 (70) observaron que había la deposición de la molécula C3 tanto en cepas patógenas como en saprófitas de *Leptospira* spp., pero la deposición de moléculas de la vía terminal como C6 o C7, para que se lleve a cabo la formación del MAC y finalmente la lisis de *Leptospira* spp., es mayor en las cepas saprófitas que en las patógenas, adicionalmente en los ensayos de sobrevivencia muestran que las serovariedades patógenas resisten al SHN, nuestros datos y los de Moreno *et. al.*, 2019 (53) refuerzan esta información ya que las serovariedades atenuadas en cultivo tienen menor capacidad de sobrevivir al suero.

Se ha observado que otras bacterias pueden sobrevivir al efecto del sistema de complemento, gracias a la captura de los reguladores solubles, Abreu y Barbosa, 2017 informan que *E. coli* al enfrentarla con suero carente de C4BP, disminuye su sobrevivencia, indicando que requiere el C4BP para la interrupción en la cascada del sistema de complemento (69). Similarmente, *Rodentibacter pneumotropicus* (antes *Pasteurella pneumotropica*) captura FH y C4BP, esta bacteria no sobrevive en suero carente de factor H y la reconstitución paulatina incrementa su sobrevivencia en dosis dependiente (72).

Finalmente, concluimos que la captura del regulador del sistema de complemento C4BP es mayor en cepas de bajo pasaje en comparación con las del alto pasaje, el pasaje en cultivo causa la pérdida de virulencia al aumentar su susceptibilidad al SHN, ya que hay una correlación positiva entre la capacidad de captura de reguladores y la de sobrevivir frente al SHN (59), nuestros datos de correlación entre la capacidad de captura de C4BP y la capacidad de resistir al suero lo corroboran, indicando que la captura de los reguladores logra la interrupción de la cascada del complemento en la vía

clásica y de lectinas, las cuales demuestran ser importantes y eficaces en la opsonización de los patógenos promoviendo la fagocitosis, inflamación y eliminación lítica de patógenos. Anteriormente Moreno *et. al.* 2019, demostró la relevancia de la captura del factor H, regulador de la vía alterna, por estas cepas de *Leptospira* spp. (53). Adicionalmente, los resultados obtenidos son consistentes con una disminución en la expresión de las proteínas que capturan reguladores solubles del complemento en las cepas atenuadas por cultivo. Moreno *et. al.* 2019 (53), observaron que las proteínas que capturan al regulador FH, LigA, LigB y Lsa23, disminuyen su expresión en las cepas patógenas atenuadas por pasaje en cultivo, estas proteínas también capturan al regulador C4BP (23) (34) (44).

Previamente Barbosa *et al.* 2009 (23), demostró que cepas patógenas de *Leptospira* spp. capturan C4BP y son capaces de evadir la vía clásica y de las lectinas del complemento. En este estudio comprobamos que cepas patógenas de *Leptospira* spp., disminuyen la capacidad de capturar C4BP y de sobrevivir a la lisis mediada el sistema de complemento, después de la atenuación por pasaje en cultivo.

En la actualidad, no existe una vacuna que genere inmunidad contra *Leptospira* spp. independiente de la serovariedad, por lo que, es importante comprender la interacción de las proteínas de superficie de esta bacteria con los reguladores del complemento en la evasión del sistema inmune, ya que, la captura de estos reguladores, evita la eliminación de serovariedades patógenas de *Leptospira* spp. Se ha demostrado que la proteína LigA, recombinante (rLigA) confiere protección inmune contra la infección de *Leptospira* spp. en hámsteres (63) (73). Adicionalmente, Ghazali *et. al.*, 2019 mostraron que las proteínas LenA y LcpA recombinantes (rLenA y rLcpA) generan respuesta inmune de tipo Th1 (64), lo que sugiere que las proteínas de superficie que interactúan con componentes de la matriz extracelular del

hospedero y capturan reguladores del complemento podrían ser candidatas para una vacuna independiente de serovariedad.

V. LITERATURA CITADA

Referencias

1. Ko A, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7(10): p. 736-747.
2. Costa F, Hagan J, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira M, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(9): p. e0003898.
3. Adler B. Pathogenesis of leptospirosis: Cellular and molecular aspects. *Vet Microbiol*. 2014; 172(3-4): p. 353–358.
4. Levett P. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14(2): p. 296–326.
5. Gouveia E, Metcalfe J, de Carvalho A, Aires T, Villasboas-Bisneto J, Queiroz A, et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14(3): p. 505–508.
6. Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*. 2010; 140(3-4): p. 287–296.
7. Wang Y, Zhuang X, Zhong Y, Zhang C, Zhang Y, Zeng L, et al. Distribution of Plasmids in Distinct *Leptospira* Pathogenic Species. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(11): p. e0004220.
8. Bourhy P, Salaün L, Lajus A, Médigue C, Boursaux-Eude C, Picardeau M. A genomic island of the pathogen *Leptospira interrogans* serovar Lai can excise from its chromosome. *Infect Immun*. 2007; 75(2): p. 677–683.
9. Vincent A, Schiettekatte O, Goarant C, Neela V, Bernet E, Thibeaux R, et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(5): p. e0007270.
10. Ahmed N, Devi S, Valverde Mde L, Vijayachari P, Machang'u R, Ellis W, et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006; 5(28).
11. Pinna A, Martins G, Hamond C, Medeiros M, de Souza G, Lilenbaum W. Potential differences between *Leptospira* serovars, host-adapted (Bratislava) and incidental (Copenhageni), in determining reproductive disorders in embryo transfer recipient mares in Brazil. *Vet Rec*. 2014; 174(21): p. 531.
12. Verma A, Stevenson B, Adler B. Leptospirosis in horses. *Vet Microbiol*. 2013; 167(1-2): p. 61-66.
13. Ramos A, Souza G, Lilenbaum W. Influence of leptospirosis on reproductive performance of sows in Brazil. *Theriogenology*. 2006; 66: p. 1021-1025.
14. Ellis WA. Animal Leptospirosis. In Adler B, editor. *Leptospira* and Leptospirosis: Current Topics in Microbiology and Immunology; 2015. p. 99–137.
15. Miotto B, Guilloux A, Tozzi B, Moreno L, da Hora A, Dias R, et al. Prospective study of canine leptospirosis in shelter and stray dog populations: Identification of chronic carriers and different *Leptospira* species infecting dogs. *PLoS One*. 2018; 13(7): p. e0200384.

16. Spangler D, Kish D, Beigel B, Morgan J, Gruszynski K, Naikare H, et al. Leptospiral shedding and seropositivity in shelter dogs in the Cumberland Gap Region of Southeastern Appalachia. *PLoS One*. 2020; 15(1): p. e0228038.
17. Carmona Gasca C, Martínez González S, Castillo Sánchez L, Rodríguez Reyes E, Cárdenas Marrufo M, Vado Solís I, et al. The Presence of a Virulent Clone of *Leptospira interrogans* Serovar Canicola in Confirmed Cases of Asymptomatic Dog Carriers in Mexico. *Microorganisms*. 2024; 12(4): p. 674.
18. Ellis WA. Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? *Vet Rec*. 2010; 167(16): p. 602-605.
19. Santos A, Ribeiro P, da França G, Souza F, Ramos E, Figueira C, et al. *Leptospira interrogans* biofilm formation in *Rattus norvegicus* (Norway rats) natural reservoirs. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021; 15(9): p. e0009736.
20. Bharti A, Nally J, Ricaldi J, Matthias M, Diaz M, Lovett M, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3(12): p. 757-771.
21. Sterling CR, Thiermann AB. Urban Rats as Chronic Carriers of Leptospirosis: An Ultrastructural Investigation. *Vet. Pathol*. 1981; 18(5): p. 628-637.
22. da Silva L, Miragaia Ldos S, Breda L, Abe C, Schmidt M, Moro A, et al. Pathogenic *Leptospira* species acquire factor H and vitronectin via the surface protein LcpA. *Infect Immun*. 2015; 83(3): p. 888-897.
23. Barbosa A, Abreu P, Vasconcellos S, Morais Z, Gonçalves A, Silva A, et al. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infect Immun*. 2009; 77(3): p. 1137-1143.
24. Haake DA, Zückert WR. The Leptospiral Outer Membrane. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;(387): p. 187–221.
25. Murray GL, Srikram A, Henry R, Hartskeerl RA, Sermswan RW, Adler B. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol Microbiol*. 2010; 78(3): p. 701-709.
26. Raddi G, Morado DR, Yan J, Haake DA, Yang XF, Liu J. Three-Dimensional Structures of Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* Species Revealed by Cryo-Electron Tomography. *J Bacteriol*. 2012; 194(6): p. 1299–1306.
27. Koizumi N, Watanabe H. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiol Lett*. 2003; 226(2): p. 215-219.
28. Ristow P, Bourhy P, da Cruz McBride F, Figueira C, Huerre M, Ave P, et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog*. 2007; 3(7): p. e97.
29. Matsunaga J, Young T, Barnett J, Barnett D, Bolin C, Haake D. Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein. *Infect Immun*. 2002; 70(1): p. 323–334.
30. Matsunaga J, Barocchi M, Croda J, Young T, Sanchez Y, Siqueira I, et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol*. 2003; 49(4): p. 929–945.
31. Picardeau M. *Leptospira* and Leptospirosis. In Koizumi N, Picardeau M, editors. *Leptospira* spp. Methods and Protocols.: Humana, New York; 2020. p. 271-275.
32. Samrot A, Sean T, Bhavya K, Sahithya C, Chan-Drasekaran S, Palanisamy R, et al. Leptospiral Infection, Pathogenesis and Its Diagnosis-A Review. *Pathogens*. 2021; 10(2): p. 145.

33. Villarreal Julio RG, Murillo Ramo E, Ramírez García R, Peláez Sánchez RG, Agudelo Florez PM. A Narrative review generalities of the genus *Leptospira* and its virulence factors. *Rev Med Hondur.* 2022; 90(2).
34. Fraga T, Isaac L, Barbosa A. Complement Evasion by Pathogenic *Leptospira*. *Front Immunol.* 2016; 7(623).
35. Cullen PA, Haake DA, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Rev.* 2004; 28(3): p. 291–318.
36. Verma A, Hellwage J, Artiushin S, Zipfel P, Kraiczy P, Timoney J, et al. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* 2006; 74(5): p. 2659–2666.
37. Barbosa A, Abreu P, Neves F, Atzingen M, Watanabe M, Vieira M, et al. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. *Infect Immun.* 2006; 74(11): p. 6356–6364.
38. Stevenson B, Choy H, Pinne M, Rotondi M, Miller M, Demoll E, et al. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS One.* 2007; 2(11): p. e1188.
39. Barbosa A, Monaris D, Silva L, Morais Z, Vasconcellos S, Cianciarullo A, et al. Functional characterization of LcpA, a surface-exposed protein of *Leptospira* spp. That binds the human complement regulator C4BP. *Infect Immun.* 2010; 78(7): p. 3207–3216.
40. Fraga T, Courrol Ddos S, Castiblanco-Valencia M, Hirata I, Vasconcellos S, Juliano L, et al. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. *J Infect Dis.* 2014; 209(6): p. 876–886.
41. Ballanti E, Perricone C, Greco E, Ballanti M, Di Muzio G, Chimenti M, et al. Complement and autoimmunity. *Immunol Res.* 2013; 56(2-3): p. 477–491.
42. Reis E, Mastellos D, Yancopoulou D, Risitano A, Ricklin D, Lambris J. Applying complement therapeutics to rare diseases. *Clin Immunol.* 2015; 161(2): p. 225-240.
43. Hovingh ES, van den Broek B, Jongerius I. Hijacking Complement Regulatory Proteins for Bacterial Immune Evasion. *Front. Microbiol.* 2016; 7: p. 2004.
44. Barbosa A, Isaac L. Strategies used by *Leptospira* spirochetes to evade the host complement system. *FEBS Lett.* 2020; 594(16): p. 2633-2644.
45. Xie C, Jane-Wit D, Pober J. Complement Membrane Attack Complex: New Roles, Mechanisms of Action, and Therapeutic Targets. *Am J Pathol.* 2020; 190(6): p. 1138-1150.
46. Ling M, Murali M. Analysis of the Complement System in the Clinical Immunology Laboratory. *Clin Lab Med.* 2019; 39(4): p. 579-590.
47. Afshar-Kharghan V. The role of the complement system in cancer. *J Clin Invest.* 2017; 127(3): p. 780–789.
48. Fusakio M, Mohammed J, Laumonier Y, Hoebe K, Köhl J, Mattner J. C5a regulates NKT and NK cell functions in sepsis. *J Immunol.* 2011; 187(11): p. 5805–5812.
49. Doorduyn DJ, Rooijackers SH, Heesterbeek DA. How the Membrane Attack Complex Damages the Bacterial Cell Envelope and Kills Gram-Negative Bacteria. *BioEssays.* 2019; 41(10).
50. Veloso Nogueira S, Backstedt BT, Smith AA, Qin JH, Wunder, Jr EA, Ko A, et al.

- Leptospira interrogans* Enolase Is Secreted Extracellularly and Interacts with Plasminogen. PLoS One. 2013; 8(10): p. e78150.
51. Oliveira P, Courrol D, Chura-Chambi R, Morganti L, Souza G, Franzolin M, et al. Inactivation of the antimicrobial peptide LL-37 by pathogenic *Leptospira*. Microb Pathog. 2021; 150(104704).
 52. Courrol D, da Silva C, Prado L, Chura-Chambi R, Morganti L, de Souza G, et al. Leptolysin, a *Leptospira* secreted metalloprotease of the pappalysin family with broad-spectrum activity. Front Cell Infect Microbiol. 2022; 12(966370).
 53. Moreno-Torres A, Malvido-Jiménez I, de la Peña-Moctezuma A, Castillo Sánchez L, Fraga T, Barbosa A, et al. Culture-attenuated pathogenic *Leptospira* lose the ability to survive to complement-mediated-killing due to lower expression of factor H binding proteins. Microbes Infect. 2019; 21(8-9): p. 377-385.
 54. Wolff G, Castiblanco-Valencia MM, Abe M, Monaris D, Morais ZM, Souza GO, et al. Interaction of *Leptospira* Elongation Factor Tu with Plasminogen and Complement Factor H: A Metabolic Leptospiral Protein with Moonlighting Activities. PLoS One. 2013; 11(e81818).
 55. De Paula PF, Barbosa JE, Junior PR, Ferriani VPL, Latorre MRDO, Nudelman V, et al. Ontogeny of Complement Regulatory Proteins – Concentrations of Factor H, Factor I, C4b-Binding Protein, Properdin and Vitronectin in Healthy Children of Different Ages and in Adults. Scand J Immunol. 2003; 58(5).
 56. Blom AM, Kask L, Dahlbäck B. Structural Requirements for the Complement Regulatory Activities of C4BP. J Biol Chem. 2001; 276(29): p. 27136–27144.
 57. Härdig Y, Hillarp A, Dahlbäck B. The amino-terminal module of the C4b-binding protein α -chain is crucial for C4b binding and factor I-cofactor function. Biochem. J. 1997; 323(469–475).
 58. Breda L, Hsieh C, Castiblanco Valencia M, da Silva L, Barbosa A, Blom A, et al. Fine Mapping of the Interaction between C4b-Binding Protein and Outer Membrane Proteins LigA and LigB of Pathogenic *Leptospira interrogans*. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(10): p. e0004192.
 59. Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. Microb Pathog. 2005; 39(4): p. 139-147.
 60. Bashiru G, Rani Bahaman A. Advances & challenges in leptospiral vaccine development. Indian J Med Res. 2018; 147(1): p. 15–22.
 61. Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjkowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A, et al. Identification of the Hemolysis-Associated Protein 1 as a Cross-Protective Immunogen of *Leptospira interrogans* by Adenovirus-Mediated Vaccination. Infect Immun. 2001; 69(11): p. 6831–6838.
 62. Branger C, Chatrenet B, Gauvrit A, Aviat F, Aubert A, Bach JM, et al. Protection against *Leptospira interrogans* Sensus Lato Challenge by DNA Immunization with the Gene Encoding Hemolysin-Associated Protein 1. Infect Immun. 2005; 73(7): p. 4062–4069.
 63. Palaniappan RUM, McDonough SP, Divers TJ, Chen CS, Pan MJ, Matsumoto M, et al. Immunoprotection of Recombinant Leptospiral Immunoglobulin-Like Protein A against *Leptospira interrogans* Serovar Pomona Infection. Infect Immun. 2006; 74(3).
 64. Ghazali-Bina M, Pourmand M, Mirshafiey A, Bakhtiari R, Khaledi A, Kazemian H, et al. Vaccine potential of LenA and LcpA proteins of *Leptospira interrogans* in combination

- with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, B subunit (LTB). Iran J Microbiol. 2019; 11(1): p. 39-47.
65. Krukoni ES, Thomson JJ. Complement evasion mechanisms of the systemic pathogens *Yersiniae* and *Salmonellae*. FEBS Letters. 2020; 594(2598-2620).
 66. Rooijackers SHM, Van Strijp JAG. Bacterial complement evasion. Mol Immunol. 2007; 44(23-32).
 67. Lambris D, Ricklin D, Geisbrecht. Complement evasion by human pathogens. Nat Rev Microbiol. 2008; 6 (2)(132-42).
 68. Barbosa AS, Isaac L. Complement Immune Evasion by Spirochetes. In Adler B, editor. Spirochete Biology: The Post Genomic Era: Springer; 2018. p. 215-238.
 69. Abreu AG, Barbosa AS. How *Escherichia coli* Circumvent Complement-Mediated Killing. Front Immunol. 2017; 8(452).
 70. Alves da Silva YO, Moura Midon L, Bryan Heinemann M, de Moraes Vasconcelos D, Silva Barbosa A, Isaac L. Contribution of Complement System pathways to the killing of *Leptospira* spp. Microbes Infect. 2020; 22(550-557).
 71. Granados Martinez AP, Estima Abreu PA, de Arruda Vasconcellos S, Lee Ho P, Ferreira VP, Saggi G, et al. The Role of Properdin in Killing of Non-Pathogenic *Leptospira biflexa*. Front Immunol. 2020; 11(572562).
 72. Sahagún-Ruiz A, Granados Martinez P, Dantas Breda LC, Rodrigues Fraga T, Castiblanco Valencia MM, Silva Barbosa A, et al. *Pasteurella pneumotropica* Evades the Human Complement System by Acquisition of the Complement Regulators Factor H and C4BP. PLoS One. 2014; 9(10): p. e111194.
 73. Silva ÉF, Medeiros A, McBride AJA, Matsunaga J, Esteves S, Ramos JGR, et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. Vaccine. 2007; 25(33): p. 6277-86.

Abreviaturas

%	Porcentaje
µL	Microlitros
µm	Micra o Microméetro
Â	Amstrong
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
AP	Alto pasaje
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
BP	Bajo pasaje
C4BP	Proteína de Unión a C4 Binding Protein C4
CA	Atenuación en cultivo
D.O.	Densidad Óptica
DL50h	Dosis Letal 50
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EF-Tu	Elongation Factor Thermo unstable Factor de elongación termoinestable
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EMJH	Ellinghausen y McCullough, modificado por Johnson y Harris
FH	Factor H
g	Gramos
H	Hora

kDa	Kilodaltones
L	Litro
LcpA	Proteína A leptospiral
Len (A, B, C, D, E y F)	Proteínas similares a la endostatina
Lig (A, B, C)	Proteínas de tipo inmunoglobulina
LPS	Lipopolisacárido
LSA	Leptospiral Surface Adhesin Adhesina de Superficie de <i>Leptospira</i>
MAC	Membrane Attack Complex Complejo de ataque de membrana
MBL	Mannose binding lectin Lectina de unión a manosa
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
°C	Grados Celsius
OPD	O-Phenilenediamine
PAMP's	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Rpm	Revoluciones por minuto
SHN	Suero humano normal
SHN-I	Suero Humano Normal Inactivado
Sv	Serovariedad
xg	Gravedades

Anexos

Anexo 1. Preparación de medio EMJH modificado 500 mL

Medio base

Peptona (BD Bioxon)	0.15 g
Extracto de carne	0.1 g
Fosfato disódico	0.5 g
Fosfato monopotásico	0.15 g
Cloruro de sodio	0.5 g
Cloruro de amonio	0.125 g
Tiamina (500 µL sol. 0.05g/10 mL agua destilada estéril)	0.0002 g

Soluciones

L-asparagina (0.18 g cbp 6 mL de H ₂ O destilada)	2.5 mL
Sol. Cloruro de calcio y magnesio A 2 mL de H ₂ O destilada agregar: 0.026 gr CaCl ₂ * 2H ₂ O 0.0426 gr MgCl ₂ * 6H ₂ O	0.5 mL
Piruvato de sodio A 2 mL de H ₂ O destilada agregar: 0.02 g CH ₃ COCOONa	0.5 mL
Suero de conejo inactivado 10% (56°C/30 min)	50 mL
Glicerol	2.5 mL

Nota: el suero de conejo se coloca en baño maría a 56°C/30 min, una vez esté a temperatura ambiente se filtra con membranas de filtración de Millipore® de 0.60, 0.45 y 0.22 µm y prefiltro de 0.22 µm, en cabina de bioseguridad clase II. Servir en un frasco de vidrio estéril; se coloca el medio en prueba de esterilidad (37°C/24 h) y almacenar a 4°C. Cada vez que se use el medio atemperar previamente y servir en cabina de bioseguridad clase II.

Anexo 2. Preparación de soluciones para ELISA

PBS Solución stock 10X, 1L

Cloruro de sodio (NaCl_2)	80 g
Cloruro de potasio (KCl_2)	2 g
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	14.4 g
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	2.4 g

Homogenizar totalmente y ajustar el pH a 7.4, aforar a 1L y esterilizar en autoclave

Nota: la solución de trabajo se usa en una concentración de 1X.

Solución amortiguadora de carbonato a 100 mM

Carbonato de sodio anhidro 10.599 g

Homogenizar bien y ajustar pH a 9.6, aforar a 500 mL y almacenar en refrigeración

Solución amortiguadora Citrato fosfato

Ácido cítrico monohidratado en polvo	2.6 g
Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4)	6.9 g

Homogenizar totalmente y ajustar el pH a 5.0, aforar a 500 mL.

Anexo 3. Protocolo para el ensayo de ELISA para determinar la capacidad de captura de C4BP por cepas de *Leptospira* spp. (Moreno et al., 2019, modificado)

Preparación de la placa

1. Realizar una dilución 1:20 (50 μ L de cultivo de *Leptospira* + 950 μ L de medio EMJH) y depositar 10 μ L en la cámara de Petroff-Hausser.
2. Ajustar el número de bacterias a 2×10^8 leptospiras/mL y medir el volumen necesario, se mide la cantidad doble para el control negativo de las respectivas cepas.
3. Retirar el medio EMJH de las leptospiras, centrifugando a 11.600 xg a 20°C/25 min, decantar el sobrenadante, cuidando de no remover el sedimento.
4. Lavar 1 vez, adicionando 500 μ L de PBS pH 7.4 y centrifugar a 11.600 xg a 20°C/10 min, retirar el sobrenadante con pipeta.
5. Incubar 1 juego de cepas de leptospiras con SHN al 40%, con un volumen final de 200 μ L, durante 15 min a 37°C y posteriormente detener la reacción del complemento en hielo durante 1 min.
6. Centrifugar y lavar el sedimento 3 veces con PBS pH 7.4 a 11.600 xg a 10°C/10 min.
7. Resuspender el botón de células en 200 μ L en solución amortiguadora de carbonato pH 9.6 y recubrir 100 μ L en los pozos de la placa de ELISA (1×10^8 Leptospiras/mL en cada pozo).
8. Incubar la placa a 4°C toda la noche
9. Lavar la placa 3 veces (200 μ L/pozo) con PBS-T [PBS + 0.05% Tween 20 (0.1 mL en 200 mL de PBS 1X pH 7.4)].
10. Bloquear la placa de ELISA con 200 μ L/pozo de BSA al 3% en PBS-T e incubar por 1 h a 37°C.

Detección de la capacidad de captura

1. Lavar la placa 1 vez (200 μ L/pozo) con PBS-T.
2. Adicionar 100 μ L/pozo del anticuerpo monoclonal de ratón IgG2b anti-C4BP humano en una dilución de 1:8000 (0.5 μ L en 3.999,5 μ L de PBS-T) + 1% de BSA (0.04 g) e Incubar 1 hora a 37°C.
3. Lavar la placa 3 veces (200 μ L/pozo) con PBS-T [PBS + 0.05% Tween 20 (0.1 mL en 200 mL de PBS 1X pH 7.4)].
4. Adicionar 100 μ L/pozo anticuerpos policlonales de cabra conjugados con peroxidasa anti- ratón IgG2b en una dilución de 1:10.000 (0.5 μ L en 4.999,5 μ L de PBS-T) + 1% de BSA (0.05 g) e Incubar 1 hora a 37°C
5. Lavar la placa 3 veces (200 μ L/pozo) con PBS-T [PBS + 0.05% Tween 20 (0.1 mL en 200 mL de PBS 1X pH 7.4)].

Revelado de la placa

1. Adicionar 100 μ L/pozo de la solución de revelado (En 5 mL de la solución amortiguadora citrato fosfato pH 5.0, adicionar un comprimido de OPD + 5 μ L de H₂O₂).
2. Dejar reaccionar máximo durante 15 min (estar pendiente del viraje de color, se debe cuidar que las diferencias se mantengan observables).
3. Detener la reacción con H₂SO₄ 4N, adicionando 50 μ L/pozo.

Lectura de la placa

1. Leer a 492 nm en el lector de ELISA.
2. Guardar los datos de D.O. 492 nm y graficarlos.

Anexo 4. Protocolo para el ensayo de sobrevivencia frente al 40% de SHN de cepas de *Leptospira* spp. (Barbosa et al., 2009; Moreno et al., 2019)

1. Realizar una dilución 1:20 (50 μ L de cultivo de *Leptospira* + 950 μ L de medio EMJH) y depositar 10 μ L en la cámara de Petroff-Hausser.
2. Ajustar el número de bacterias a 5×10^6 Leptospiras/mL y medir el volumen necesario, se mide la cantidad doble para el control negativo de las respectivas cepas.
3. Retirar el medio EMJH de las leptospiras, centrifugando a 11.600 xg a 20°C/20 min, decantar el sobrenadante, cuidando de no remover el sedimento.
4. Lavar 1 vez, adicionando 500 μ L de PBS pH 7.4 y centrifugar a 11.600 xg a 20°C/10 min, retirar el sobrenadante con pipeta.
5. Tomar una alícuota de suero colocarle Parafilm en la tapa para sellarlo completamente y colocarlo en baño maría a 56°C/30 min, para obtener SHN-I.
6. Incubar 1 juego de cepas de leptospiras con SHN al 40% y el otro juego de cepas con SHN-I al 40%, con un volumen final de 200 μ L, durante 1 h a 37°C y posteriormente detener la reacción del complemento en hielo durante 1 min.
7. Hacer una dilución 1:10 con un volumen final de 200 μ L, servir 180 μ L de medio EMJH y 20 μ L de la suspensión bacteriana expuesta a SHN o a SHN-I por triplicado.
8. Tapar la placa, sellarla con Parafilm e incubar 4 días a 30°C.
9. Luego de los 4 días de incubación, tomar 10 μ L y contar en cámara de Petroff Hausser los tres pozos con SHN y los tres pozos con SHN-I.
10. Tomar como 100% el número de leptospiras incubadas con SHN-I y calcular el porcentaje de sobrevivencia frente SHN.

Anexo 5. Preparación de soluciones para SDS-PAGE 10% y Western blot

Preparación de Tris-HCl pH 6,8 – 8,0 y 8.8, 500 mL

Tris-base 60.57 g
Ajustar el pH requerido con HCl, dejar reposar 1 noche y volver ajustar el pH, aforar y esterilizar.

Preparación de SDS (Dodecilsulfato de sodio) al 10%, 500 mL

Dodecilsulfato de sodio 50 g

Preparación de Persulfato de amonio 10%, 50 mL

Persulfato de amonio 5 g

Buffer de muestra 5X

Tris-HCl 250 mM pH 6.8
SDS 10%
Glicerol al 50%
Azul de bromofenol al 0.5%

Buffer de corrida 10X, 1L

Tris base 25 mM	30.2 g
Glicina 192 Mm	144 g
SDS 0.1%	10 g
Agua destilada	800 mL

Buffer de transferencia 10X

Tris base 25 mM	30.2 g
Glicina 192 Mm	144 g
Metanol	-
Agua destilada	800 mL

El metanol se agrega antes de usar el buffer de transferencia

La solución de trabajo del buffer de corrida y de transferencia se prepara a una concentración de 1X.

Azul de Coomassie 300 mL

1. Metanol	120 mL
2. Ácido acético glacial	30 mL
3. Azul brillante G	0.15 gr
4. Agua destilada	180 mL

Solución desteñidora 300 mL

1. Etanol absoluto	120 mL
2. Ácido acético glacial	30 mL
3. Agua destilada	150 mL

Anexo 6. Protocolo de SDS-PAGE 10% (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio)

1. Realizar una dilución 1:20 (50 μ L de cultivo de *Leptospira* + 950 μ L de medio EMJH) y depositar 10 μ L en la cámara de Petroff-Hausser.
2. Ajustar el número de bacterias a 1×10^9 Leptospiras/mL y medir el volumen necesario, se mide la cantidad doble para el control negativo de las respectivas cepas.
3. Retirar el medio EMJH de las leptospiras, centrifugando a 9000 xg a 20°C/25 min, decantar el sobrenadante, cuidando de no remover el sedimento.
4. Lavar 3 veces, adicionando 500 μ L de PBS pH 7.4 y centrifugar a 9000 xg a 20°C/10 min, decantar el sobrenadante, cuidando de no remover el sedimento y en el tercer lavado retirar el sobrenadante con pipeta.
5. Incubar las leptospiras con SHN al 40%, con un volumen final de 200 μ L, durante 15 min a 37°C y posteriormente detener la reacción del complemento en hielo durante 1 min.
6. Centrifugar y lavar el sedimento 5 veces con PBS pH 7.4 a 11.600 xg a 10°C/10 min y recoger la última fracción de lavado.
7. Eluir las proteínas adicionando 100 μ L de Glicina-HCl pH 2.0 a las bacterias sedimentadas e incubar por 5 min.
8. Centrifugar a 9000 xg a 20°C/10 min, tomar 90 μ L transferirlos a un eppendorf y neutralizar con 10 μ L de Tris-HCl pH 8.0 y mezclar con pipeta.
9. Adicionar 5 μ L de Buffer de muestra a 20 μ L del eluido como de la última fracción de lavado, hervir durante 5 min a 95°C.
10. Cargar las muestras y correrlas, en condiciones no reductoras, a 90 volts durante 30 min, para que el gel concentrador y 1.50 h para el gel separador, con gel de corrida.
11. Uno de los dos geles se tiñe con azul de coomassie toda la noche y luego desteñirlo para observar la separación de proteínas

Transferencia a membrana de nitrocelulosa

1. Realizar el ensamble del sándwich, asegurándose de no dejar burbujas entre el gel de poliacrilamida y la membrana de nitrocelulosa.
2. Llenar la cámara de buffer de transferencia y hacer la transferencia por 1 h a 350 mA a 4°C.

Detección

1. Bloquear la membrana de nitrocelulosa con leche baja en grasa al 5% y dejarla toda la noche a 4°C, en agitación constante 120 rpm.
2. Lavar la membrana 3 veces con PBS-T / 5 min, en agitación constante.
3. Colocar el anticuerpo monoclonal de ratón IgG2b anti-C4BP humano 1:500 en un volumen final de 15 mL + 1% de leche baja en grasa, e incubar por 1 hora a temperatura ambiente, en agitación constante 120 rpm
4. Lavar la membrana 3 veces con PBS-T / 5 min, en agitación constante.
5. Agregar anticuerpos policlonales de cabra conjugados con peroxidasa anti-IgG2b de ratón en una dilución de 1:10.000 a un volumen final de 20 mL + 1% de leche baja en grasa, e incubar por 1 hora a temperatura ambiente, en agitación constante 120 rpm.
6. Revelar

Anexo 7. Tabla de datos de Captura del regulador C4BP en 40% de SHN por cepas de bajo y alto pasaje de *Leptospira* spp.

SHN	<i>L. interrogans</i> LOCaS46 BP	<i>L. interrogans</i> LOCaS46 AP	<i>L. interrogans</i> LOVe30 BP	<i>L. interrogans</i> LOVe30 AP	<i>L. santarosai</i> MOCA45 BP	<i>L. santarosai</i> MOCA45 AP	<i>L. biflexa</i> Patoc I							
0,935	0,075	0,836	0,069	0,597	0,06	0,904	0,048	0,676	0,068	0,695	0,067	0,349	0,058	0,479
1,278	0,056	0,959	0,058	0,561	0,046	0,833	0,05	0,639	0,084	0,629	0,065	0,26	0,069	0,387
1,06	0,048	0,888	0,056	0,406	0,052	1,076	0,05	0,632	0,058	0,858	0,067	0,334	0,076	0,316
1,406	0,048	0,976	0,051	0,457	0,072	1,05	0,094	0,569	0,062	0,865	0,089	0,34	0,081	0,322
1,073	0,049	0,935	0,053	0,577	0,049	0,956	0,054	0,625	0,089	0,672	0,079	0,388	0,074	0,328
0,869	0,052	0,989	0,049	0,516	0,05	0,87	0,048	0,652	0,084	0,688	0,092	0,334	0,083	0,315
1,34													0,069	0,354
1,183													0,073	0,308
1,208														
1,436														
1,343														
0,834														

Anexo 8. Porcentaje de sobrevivencia al 40% de SHN en cepas de bajo y alto pasaje de *Leptospira* spp.

<i>L. interrogans</i> LOCaS46 BP	<i>L. interrogans</i> LOCaS46 AP	<i>L. interrogans</i> LOVe30 BP	<i>L. interrogans</i> LOVe30 AP	<i>L. santarosai</i> MOCA45 BP	<i>L. santarosai</i> MOCA45 AP
50	36	50	5	33	9
52	30	46	2	29	10
55	36	47	3,5	31	17

Anexo 9. Porcentajes de captura de C4BP en D.O. 492 nm y sobrevivencia en 40% de SHN y sus respectivos arcosenos de cepas de bajo y alto pasaje de *Leptospira* spp.

C4BP	% D.O. 492 nm	Arcoseno	% Sobrevivencia	Arcoseno
LOCaS46 BP	79%	0,910808997	52%	0,546850951
LOCaS46 AP	44%	0,455598673	34%	0,346916898
LOVe30 BP	80%	0,927295218	48%	0,500654712
LOVe30 AP	53%	0,558600565	4%	0,040010674
MOCA45 BP	62%	0,668742703	31%	0,315193032
MOCA45 AP	28%	0,283794109	12%	0,120289882
Patoc I	27%	0,273393031	0%	0

Anexo 10. Formato del consentimiento informado

A ____ de _____ de 2024

Yo _____, identificado (a) con CURP _____ manifiesto que he sido informado (a) del procedimiento de la obtención de suero como fuente de C4BP y que será utilizado únicamente con fines académicos en los ensayos de la tesis titulada: EVALUACIÓN DE LA CAPTURA DEL REGULADOR C4BP POR CEPAS DE BAJO Y ALTO PASAJE DE *Leptospira* spp. Y EL EFECTO EN SU SOBREVIVENCIA AL SISTEMA DE COMPLEMENTO, llevada a cabo en la FMVZ-UNAM, en el departamento de Microbiología en Inmunología, laboratorio de Inmunología Molecular; manteniendo mi información como paciente de manera anónima. Adicionalmente, he leído, entendido y recibido toda la información acerca de los efectos secundarios que conlleva la toma de la muestra y se me ha respondido todas las preguntas que me han surgido con respecto a la utilización de mi muestra.

Nombre:

Firma:
