

Expresión de antígenos recombinantes de *Treponema pallidum* para el desarrollo de test de diagnóstico de Sífilis



Lic. Victoria Veroli

Imagen de tapa: Corresponde al dispositivo utilizado para la recolección de sangre (ó líquido cerebroespinal) para la realización del primer test de detección de sífilis, desarrollado por August Paul von Wassermann.

Crédito fotográfico:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/89/Specimen_bottle_for_blood_for_a_test_for_syphilis%2C_England%2C_Wellcome_L0058017.jpg



Tesis de Maestría en Biotecnología

Expresión de antígenos recombinantes de Treponema pallidum para el desarrollo de test de diagnóstico de Sífilis

Lic. Victoria Veroli

**Tutores: Dra. Mónica Marín
Dr. Mario Señorale**

**Sección Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad de la República
Uruguay**

**Tribunal: Dra. Leda Roche
Dra. Estela Castillo
Dra. Iris Miraballes**

Agosto 2016

Agradecimientos

A mis tutores, Mónica y Mario, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de maestría en su laboratorio, pero principalmente por la confianza que me dieron desde el primer momento, que me ayudó a seguir adelante en mi crecimiento como científica. No hay palabras suficientes para expresar mi agradecimiento.

A todos los integrantes de la Sección Bioquímica, a los que están y estuvieron, por haberme hecho sentir a la sección como mi segundo hogar. En especial a las salas 305 y 314, las cómplices de muchos momentos de alegría.

A Andrea Villarino por haberme ayudado a dar los primeros pasos en la docencia.

A todo el grupo de Área Farmacología-CIENFAR de Facultad de Química, especialmente a la Dra Laura Domínguez y la Dra Beatriz Munguía, por haberme dejado participar de sus proyectos de investigación y sobre todo porque en ellas encontré a dos grandes personas.

A Javier Urioste por haberme dado los sueros utilizados en este trabajo y a Paula Tucci por la ayuda con los ensayos serológicos.

A las integrantes del tribunal de corrección por haber aceptado evaluar este trabajo.

A la ANII por la beca de Maestría dentro de la cual se enmarca este trabajo.

A mi padre, por haberme apoyado en la decisión de seguir con mi formación como científica y jugármela por lo que me apasiona.

A mi madre, por darme siempre para adelante, por alegrarse hasta con mis más mínimos logros.

A mi hermano, por darme la confianza en mí misma en momentos de debilidad y ser mi cable a tierra, en todo momento de mi vida.

A mi abuela, por haberme cuidado desde el momento que vine a Montevideo. Por sus enseñanzas, por su paciencia.

A Braulio, por ser mi compañero, estar a mi lado y llevarme a ampliar mis horizontes.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1- “Por una hora con Venus, veinte años con Mercurio”	4
2.2- Sífilis: la gran impostora	6
2.3- La Sífilis en Uruguay y el mundo	9
2.4- Métodos de diagnóstico de Sífilis	13
2.4.1- Tests serológicos no-treponémicos	15
Test VDRL (<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>)	16
Test RPR (<i>Rapid Plasma Reagin</i>)	16
2.4.2- Tests serológicos treponémicos	17
Test FTA-ABS (<i>Fluorescent Treponemal Antibody Absorption</i>)	18
Tests TPHA (<i>Treponema pallidum Haemagglutination</i>) y TPPA (<i>Treponema pallidum Particle Agglutination</i>)	18
EIA (Inmunoensayo enzimático inmunogénico)	19
Ensayo por <i>Western blot</i> de <i>Treponema</i>	19
Test POC (<i>Point of Care</i>)	20
2.4.3- Uso apropiado de los tests serológicos para Sífilis	22
Algoritmo tradicional	22
Algoritmo de secuencia reversa	22
2.4.4- Diagnóstico de Sífilis congénita en el laboratorio	23
2.5- <i>Treponema pallidum subsp pallidum</i>	24
2.6- Patogenicidad y respuesta inmune a <i>Treponema</i>	26
2.6.1- Lipoproteínas y sistema inmune	28
2.7- Lipoproteínas Tpp15, Tpp17 y Tpp47	28
2.7.1- Tpp15	28
2.7.2- Tpp17	29
2.7.3- Tpp47	30
3. Objetivos	31
3.1- Objetivo general	32
3.2- Objetivos específicos	32
4. Materiales	33
4.1- Plásmidos	34
4.1.1- pUC57	34
4.1.2- pET22b(+)	34
4.2- Cepas de <i>E. coli</i>	35
4.2.1- DH5 α (Invitrogen)	35
4.2.2- BL21(DE3) <i>Star</i> (Invitrogen)	35
4.3- Medios de cultivos	36
4.3.1- Medio Luria Broth (LB)	36
4.3.2- Medio Autoinductor ZYM-5052	36
4.4 - Anticuerpos	36

5. Métodos	37
5.1 - Construcción de plásmidos	38
5.1.1- Clonado de secuencias en pET22b(+)	38
5.1.2- Reacción de amplificación de Tpp15opt	38
5.1.3- Electroforesis en gel de agarosa	38
5.1.4- Transformación de células quimiocompetentes (DH5 α y BL21)	38
5.1.5- Amplificación y extracción de ADN plasmídico	38
5.2 - Expresión y purificación de proteínas	39
5.2.1- Expresión de proteínas	39
5.2.2- Fraccionamiento de proteínas Soluble/Insoluble	39
5.2.3- Estrategias de renaturalización	39
Método A: Renaturalización en columna	39
Método B: Renaturalización por dilución rápida	39
5.2.4- Purificación por IMAC (Ni-NTA)	40
5.2.5- Desalado	40
5.2.6- Cuantificación de proteínas	40
5.2.7- Cromatografía de exclusión molecular	40
5.3- Western blot	41
5.4- Evaluación de las condiciones de almacenamiento	41
5.5- Electroforesis bidimensional	41
5.6- Ensayo de ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>) para la detección semicuantitativa de anticuerpos anti-Tpp en sueros humanos	41
6. Resultados y Discusión	43
6.1- Tpp15	44
6.1.1- Clonado de la secuencia optimizada de Tpp15opt-6His en el vector de expresión pET22b(+)	44
6.1.2- Expresión de Tpp15	48
6.1.3- Purificación de Tpp15 a partir de la fracción insoluble (FI): Tratamiento FI cultivo 37 °C	51
6.1.4- Purificación de Tpp15 por IMAC en columna de Ni-NTA	53
6.1.5- Análisis de los productos que co-purifican con Tpp15 en la IMAC mediante <i>western blot</i> y espectrometría de masa	55
6.1.6- Almacenamiento de Tpp15	58
6.2- Tpp17	62
6.2.1- Expresión de Tpp17	62
6.2.2- Identificación de Tpp17 mediante <i>western blot</i>	64
6.3- Tpp47	65
6.3.1- Expresión de Tpp47	65
6.3.2- Purificación de Tpp47 por IMAC (Ni-NTA) y cromatografía de exclusión molecular	67
6.3.3- Identificación de Tpp47 mediante <i>western blot</i>	71
6.3.4- Almacenamiento de Tpp47	72
6.4- Titulación de anticuerpos anti-Tpp15/17/47 en sueros humanos	73
7. Conclusiones	76

8. Bibliografía	81
9. Anexo	90
A0 - Marcadores de peso molecular	91
A1.1 - Alineamiento entre la secuencia nucleotídica de Tpp15 salvaje (wt) y optimizada (opt)	93
A1.2 - Alineamiento entre la secuencia nucleotídica de Tpp47 salvaje (wt) y optimizada (opt)	94
A1.3 - Secuencias aminoacídicas correspondientes a Tpp15-6His y Tpp47-6His que fueron expresadas en este trabajo	97
A2.1 - Clonado de Tpp15opt-6His a partir del plásmido pUC57-Tpp15opt-6His en el plásmido pET22b(+)	98
A2.2 - Alineamiento de las secuencias de Tpp15opt obtenidas mediante secuenciación con primers T7 forward y T7 reverse	99
A3.1 - Cuantificación por ensayo de ácido bicinconínico (BCA) de Tpp15 en 2 M Urea	100
A3.2 - Cuantificación por ensayo de ácido bicinconínico (BCA) de Tpp15 expresada a 37°C	101
A3.3 - Cuantificación por ensayo de ácido bicinconínico (BCA) de Tpp15 expresada a 20°C	102
A4.1 - Cuantificación por ensayo de ácido bicinconínico (BCA) de Tpp17 expresada a 37°C	103
A5.1 - Cuantificación por ensayo de ácido bicinconínico (BCA) de Tpp47 expresada a 37°C	104
A5.2 - Cuantificación por ensayo de ácido bicinconínico (BCA) de Tpp47 expresada a 33°C	105
A5.3 - Cuantificación por ensayo de ácido bicinconínico (BCA) de Tpp47 expresada a 30°C	106
A5.4 - Cuantificación por ensayo de ácido bicinconínico (BCA) de Tpp47 expresada a 28°C	107
A5.5 - Cuantificación por ensayo de ácido bicinconínico (BCA) de Tpp47 expresada a 20°C	108

1. Resumen

La Sífilis es una enfermedad de transmisión sexual producida por la bacteria *Treponema pallidum subs. pallidum* que también puede ser transmitida de madre a hijo a través de la placenta, lo que se conoce como sífilis congénita. En Uruguay se ha detectado un incremento en el número de casos de sífilis congénita, lo que significa una gran preocupación no solo por los efectos de la enfermedad sobre el desarrollo fetal, como daños neurológicos, hepatitis, periostitis y muerte fetal, sino también por el incremento del número de personas portadoras que desconocen que están infectados y que son transmisores de la enfermedad.

Es común que ciertas manifestaciones clínicas como chancros y sarpullidos pasen desapercibidas, ya sea por descuido del infectado o por confundir las manifestaciones características de la sífilis con otras correspondientes a otro tipo de lesión cutánea o mucosa, menos severa y menos relevante. Por tanto, es necesario perfeccionar los métodos de detección serológicos de esta enfermedad ya que es la única herramienta que al ser utilizada de forma periódica permite la detección de esta infección y su inmediato tratamiento mediante la administración de antibióticos.

El objetivo general de este trabajo es contribuir con el diseño y la producción de un método de detección serológicos de la sífilis simple, rápido y de bajo costo, basado en la detección de anticuerpos anti treponema. Específicamente este trabajo tiene por objetivo específico la optimización de la expresión y purificación de las proteínas Tpp15, Tpp17 y Tpp47 en *E. coli*, que permitan obtener niveles adecuados de estas proteínas para el desarrollo de tests de diagnóstico. En una segunda etapa, se plantea la realización de ensayos preliminares para la evaluación de la capacidad de los antígenos recombinantes producidos de detectar los anticuerpos específicos anti-Tpp en sueros de pacientes con Sífilis.

2. Introducción

2.1 “Por una hora con Venus, veinte años con Mercurio”¹

La sífilis es una enfermedad de transmisión sexual causada por la espiroqueta *Treponema pallidum subsp. pallidum*. Su nombre proviene de una poesía escrita por el médico italiano Gerolamo Fracastoro en 1530, en la cual un pastor llamado *Syphilus* fue castigado con la enfermedad por llevar una vida inmoral y plena de vicios. Popularmente se conocía también como la “enfermedad de los franceses” (en latín *morbus gallicus*) porque los soldados del rey francés Carlos VIII fueron arrasados por una epidemia de sífilis durante el sitio de Nápoles a fines del siglo XV (Vignale, R., Amor, F., Paciel, 1986).

El lugar de origen de esta enfermedad no ha sido elucidado. Existen dos teorías: la de los colombinos, que le atribuyen a Cristóbal Colón su introducción en Europa luego de la conquista de América y la que ubica su origen en Europa, Cercano Oriente y África. Esta última teoría se basa en excavaciones realizadas en el norte de Inglaterra en 1994 y en un estudio de 240 esqueletos que presentaban signos de haber contraído la enfermedad, lo cual establecería que la sífilis ya estaba presente en Europa antes de que Colón volviera de su primer viaje de América (Turnes, 2007).

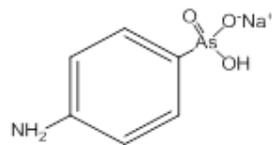
El 3 de marzo de 1905, el médico berlinés Erich Hoffmann y el zoólogo Fritz Schaudinn identifican el agente causal de la sífilis. Un año más tarde, el bacteriólogo alemán August von Wassermann desarrolló un método de análisis que permitía detectar el agente en estadios tempranos de la enfermedad; este método de análisis lleva su nombre y fue utilizado durante cincuenta años.

El primer tratamiento de la sífilis consistía en emplear un ungüento con mercurio, lo cual tenía efectos tóxicos y llegaba a matar más enfermos que la propia sífilis. De allí proviene la conocida frase “es peor el remedio que la enfermedad”. A esto se suma el hecho de que en algunos hospitales si el paciente sobrevivía al tratamiento, recibía una tunda de palos como castigo por su “carne pecadora” (Turnes, 2007).

En 1909, el médico y serólogo, Paul Ehrlich desarrolló la sustancia Salvarsán (ó 606, por haberse investigado 605 compuestos sintéticos antes) y en 1912 Neosalvarsán (ó 914, siguiendo el mismo criterio), compuestos químicos con arsénico (derivados de atoxil) que dieron lugar a la primera quimioterapia para el tratamiento de la sífilis. Si bien presentaba toxicidad hepática, el tratamiento era eficaz y permitió controlar la sífilis bajo tratamientos repetidos y prolongados. Estos compuestos fueron utilizados para el tratamiento de la sífilis hasta el descubrimiento de la Penicilina por el bacteriólogo británico Alexander Fleming, en 1928.

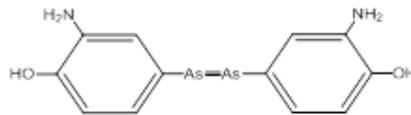
¹Las enfermedades de transmisión sexual se denominan “enfermedades venéreas”, por su derivación de la diosa griega del amor Venus (Afrodita).

a)



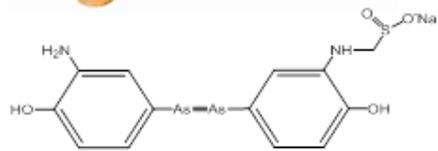
Atoxil

b)



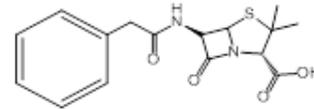
Salvarsán

c)



Neosalvarsán

d)



Penicilina

e)



f)

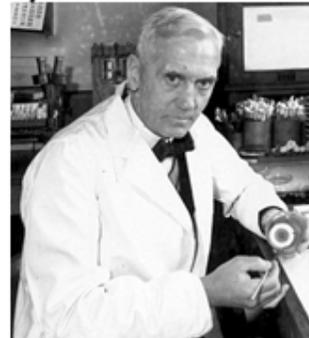


Figura 1: a) Estructura del compuesto químico con arsénico (Atoxil) a partir del cual se sintetizaron las sustancias utilizadas para el tratamiento de la sífilis a principios del siglo XX, b) Salvarsán y c) Neosalvarsán. d) Estructura de la Penicilina utilizado actualmente para el tratamiento de la sífilis. e) Médico y serólogo Paul Ehrlich. f) Bacteriólogo Alexander Fleming.

2.2 Sífilis: la gran impostora

En el transcurso de la enfermedad se distinguen diferentes etapas denominadas sífilis primaria, secundaria, latente y terciaria (**Figura 2**) (Penn, 1987). A su vez, la sífilis puede ser transmitida de madre a hijo a través de la placenta, lo cual es conocida como sífilis congénita. La sífilis primaria se caracteriza por la clásica formación de la lesión denominada “chancro”, la cual se visualiza como una pequeña erosión que suele aparecer de 10 a 90 días luego de la exposición a la espiroqueta en el sitio en el cual se estableció el contacto. Inicialmente, *Treponema pallidum* comienza a multiplicarse en el sitio de inoculación para luego diseminarse en cuestión de horas por intermedio del sistema sanguíneo y linfático hacia distintos tejidos (Fitzgerald, 1989). Algunas investigaciones incluso reportan la presencia de la espiroqueta en sangre y nódulos linfáticos luego de 5 a 30 minutos (Fitzgerald, 1987). La sífilis secundaria aparece algunas semanas después de la aparición del chancro (hasta seis meses después) como consecuencia de superar el umbral en el número de treponemas para desencadenar los síntomas correspondientes a esta etapa. Las manifestaciones más comunes en esta etapa ocurren en la piel y en las mucosas. Sin embargo, también pueden aparecer lesiones a nivel de los nódulos linfáticos, hígado, tejidos genitales, bazo, riñones, corazón, huesos, articulaciones, laringe, ojos, meninges y cerebro (Fitzgerald, 1989). La etapa latente de la sífilis no presenta manifestaciones clínicas y su detección solo puede ser realizada mediante pruebas serológicas. A partir de esta etapa latente, la persona infectada puede experimentar tres desenlaces posibles de la enfermedad: resolución espontánea de la infección, persistencia de la infección latente o desarrollo de sífilis terciaria en un lapso de unos pocos años a décadas. La sífilis terciaria puede presentarse en cualquier momento luego de latencia e incluso inmediatamente después de la etapa secundaria. La misma puede evidenciarse a través de tres variantes: neurosífilis, sífilis cardiovascular y sífilis gomosa (caracterizada por gomas similares a las presentes en la tuberculosis). La primera variante, a su vez, puede presentarse en etapas más tempranas de la sífilis debido a la alta predilección de esta espiroqueta por el sistema nervioso (Lafond, Lukehart, Lafond, & Lukehart, 2006).

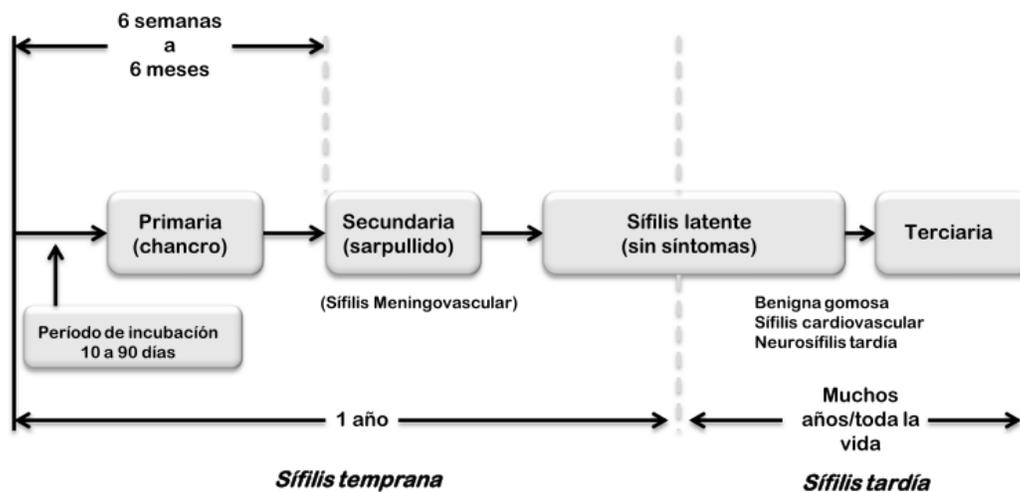


Figura 2: Etapas de la sífilis en ausencia de tratamiento. Modificado de (Unemo et al., 2013).

En la sífilis congénita, la transmisión de treponema de madre a hijo se puede efectuar en cualquiera de las etapas de la enfermedad que esté cursando la madre. Sin embargo, la transmisión transplacentaria es más favorable durante la etapa secundaria de la sífilis. A su vez, en la sífilis congénita se pueden diferenciar dos etapas: temprana y tardía. En la sífilis congénita temprana, debido a la multiplicación extensiva de treponema, los efectos congénitos son fácilmente reconocibles tanto en el nacimiento como durante los primeros dos años del niño. Las manifestaciones se vuelven aparentes usualmente 2 a 10 semanas luego del parto. El primer síntoma observado hasta en un 50% de los recién nacidos es la inflamación de la mucosa de las fosas nasales. Posteriormente, el treponema puede invadir huesos, paladar y cartílagos de la nariz. La invasión de los huesos puede desencadenar una osteocondritis, que causa dolor y pseudoparálisis. Otra lesión característica de niños con sífilis congénita temprana incluye lesiones epidérmicas, las cuales son a veces acompañadas por descamación de la piel de las palmas de las manos (Lafond et al., 2006). Contrariamente, en la sífilis congénita tardía no se observan manifestaciones clínicas aparentes debido a la presencia de un menor número de treponemas presentes en el feto. Las manifestaciones ocurren entre los 5 y los 25 años de edad. Aun así, la serología sanguínea puede llegar a ser reactiva, siendo éste el único método mediante el cual se puede diagnosticar la presencia de esta enfermedad.

Es común que en ciertos casos las manifestaciones clínicas pasen desapercibidas, ya sea por descuido de la persona infectada o por confundirse las manifestaciones características de la sífilis con otras correspondientes a otro tipo de lesión cutánea o mucosa menos severa y pasajera, razón por la cual esta enfermedad es conocida como la "gran impostora". A esto se suma el hecho de la baja o ausencia de fiebre en las primeras etapas de la sífilis (Penn, 1987). A su vez, se ha demostrado que durante las etapas primaria y secundaria de la infección se potencia la transmisión del VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) de 2 a 5 veces, promoviendo de esta forma el esparcimiento de este virus (Stamm, 2010).

La estrategia más utilizada para la disminución de las infecciones de transmisión sexual, es la "prevención", a través de campañas de concientización sobre las formas de contagio. Igualmente se informa sobre la importancia de asistir a un centro de salud en caso de haber estado expuesto a una situación de riesgo que pueda implicar el contagio. Sin embargo, se han reportado limitaciones en este sistema de prevención y control de la sífilis principalmente en los países en desarrollo. En algunos países una de las principales causas es la falta de acceso a servicios de diagnóstico (Petti, Polage, Quinn, Ronald, & Sande, 2006), así como también la dificultad para costear los estudios ofrecidos por los laboratorios (The World Bank, 2004). Los factores socioeconómicos influyen en el control de esta enfermedad, siendo más afectados los sectores sociales de contexto crítico. Esto puede explicarse por los costos de los exámenes de diagnóstico, y las distancias entre el lugar de residencia del paciente y los centros de atención de salud (ver **Figura 3**). Por ello, en muchos casos se observa que pacientes que realizaron controles médicos no regresan por los resultados, por lo cual no se realiza el tratamiento adecuado a los positivos. Esto representa un riesgo importante principalmente en el control médico de las embarazadas, ya que las consecuencias de la sífilis no tratada tendrá un efecto de por vida en el niño.

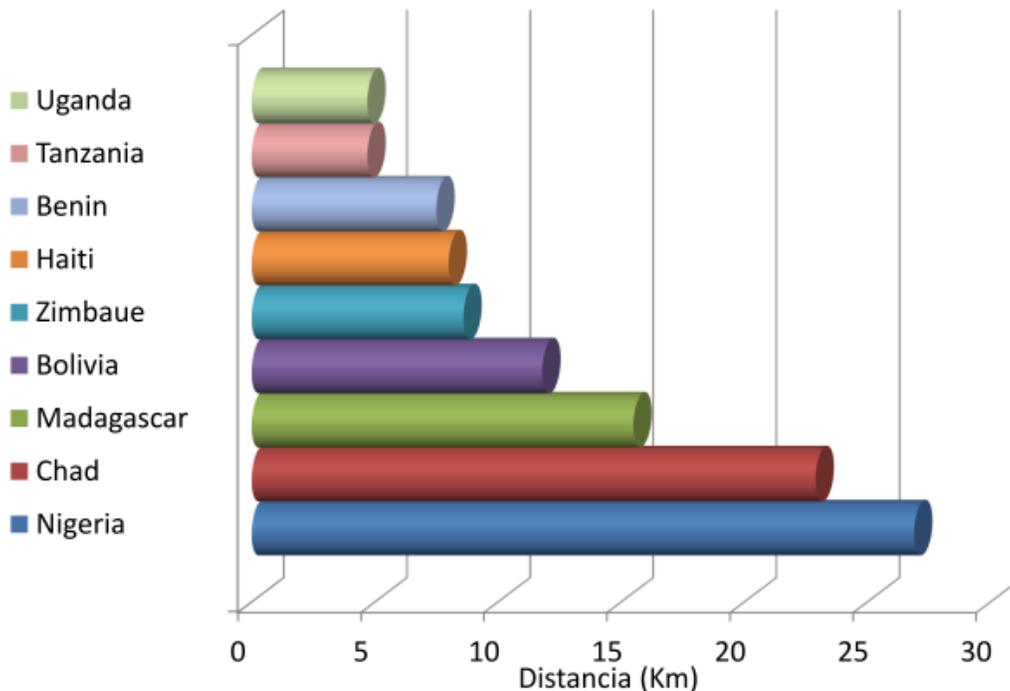


Figura 3: Distancias medias a las clínicas médicas más cercanas a zonas rurales. Modificado de (R W Peeling et al., 2006)

2.3 La sífilis en Uruguay y el mundo

El hecho de contar con métodos de diagnóstico y tratamiento sencillo podría indicar que se estaba cerca de la erradicación mundial. Sin embargo, en los últimos años se viene detectando un aumento en el número de infectados a nivel mundial. El hecho de saber que es una enfermedad para la cual existen tratamientos exitosos y creer que ha sido erradicada, hacen que la población no tome las precauciones necesarias a la hora de las prácticas sexuales. Es por ello, que al analizar el incremento que está teniendo esta enfermedad en la población, se debe tener en cuenta los comportamientos poblacionales no sólo en aquellas poblaciones de riesgo altamente asociadas al VIH (hombres homosexuales) (Babolin et al., 2011; Lafond et al., 2006) sino principalmente en las mujeres en período de gestación.

Desde el año 2000 se ha reportado un resurgimiento de la sífilis en varios países, incluyendo Estados Unidos, Canadá y algunas áreas de Europa del Este y Central. En China, la sífilis se encuentra dentro de las cinco enfermedades infecciosas más frecuentes (Yin, 2012): en 2008 nacieron 9.480 bebés con sífilis congénita (Tucker JD, Chen XS, 2010). De acuerdo con el Centro Chino para el Control y Prevención de Enfermedades, en el año 2010 se reportaron 375.309 casos de sífilis, representando un incremento del 24.5% respecto al año anterior. En el año 2007, se estimó que anualmente ocurren 12 millones de casos nuevos de sífilis congénita a nivel mundial,

principalmente en los países en desarrollo (World Health Organization, 2007), contribuyendo a 305.000 muertes de recién nacidos cada año (Newman et al., 2013).

En América Latina y Asia, se estima que de 10 mujeres embarazadas sólo 7 u 8 se realizan el diagnóstico de sífilis. Ésta representa una tasa considerablemente menor a la de los países Europeos en los cuales la misma es cercana al 100%, a pesar de presentar una baja incidencia de esta enfermedad (generalmente menor al 0.2%) (Kuznik, Muhumuza, Komakech, Marques, & Lamorde, 2015). La tasa de sífilis congénita por 100.000 nacidos vivos en Europa va de 0.0 en Dinamarca, Grecia, Hungría, Irlanda, Italia y Noruega, 0.6 en Alemania, 8.3 Polonia y 24.5 en Portugal, comparado a 57.3 en Perú, 109.6 en Argentina, 151.6 en Uruguay y 311.6 en Brasil ("Report on global sexually transmitted infection surveillance 2013," 2013).

Frente al gradual incremento de sífilis congénita en los países en desarrollo y Asia, la Organización Mundial de la Salud (OMS) crea una iniciativa global en 2007 (EMTCT, por sus siglas en inglés Eliminación de Transmisión Madre-Hijo) con el fin de eliminar la sífilis congénita como problema de salud pública ("Report on global sexually transmitted infection surveillance 2013," 2013). De acuerdo con el criterio establecido, la validación de EMTCT de sífilis se basa en que el país logre:

- Cobertura de cuidado prenatal (las mujeres embarazadas deben tener al menos una visita médica de cuidado prenatal) $\geq 95\%$.
- Cobertura de test de sífilis de cuidado prenatal $\geq 95\%$.
- Tratamiento de sífilis seropositivos de cuidado prenatal $\geq 95\%$.
- Incidencia de sífilis congénita ≤ 50 casos por 100.000 nacidos vivos.

Dentro del período comprendido entre 2008 (año en que se comienza a implementar esta iniciativa) y 2012, menos del 40% de los países evaluados (40 de 106) lograron cumplir con el porcentaje de cobertura $\geq 95\%$ para aquellas embarazadas que concurren a realizarse estudios prenatales y a las que se les realizaron diagnóstico de sífilis (**Figura 4**). Por otro lado, de los países que reportaron datos respecto al número de casos positivos de sífilis congénita que recibieron tratamiento (54 países), el 59% (32 países) superó el límite requerido por la iniciativa de la OMS (tratamiento de casos de sífilis congénita que supere el 95% de las embarazadas con sífilis) (**Figura 5**).

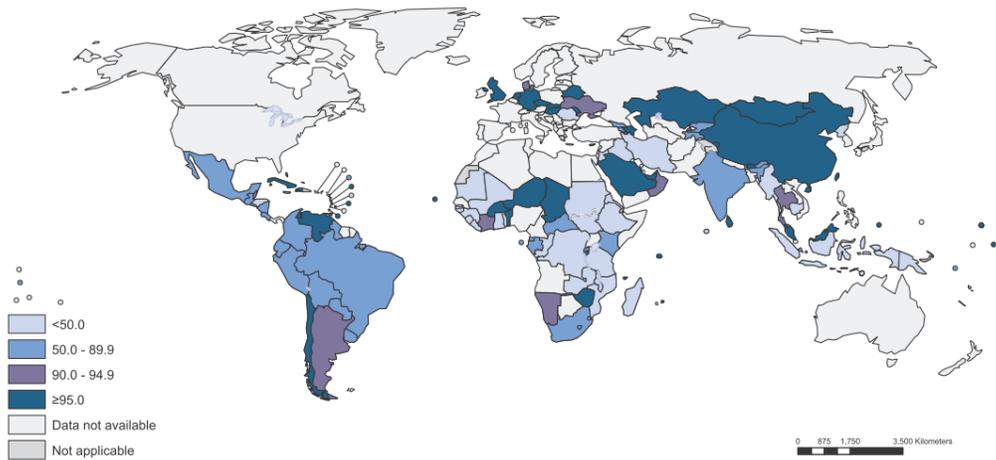


Figura 4: Porcentaje de embarazadas que concurren a consulta médica prenatal y se les realizaron controles de detección de sífilis. Fuente: WHO Global Health Observatory Data Repository (<http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>).

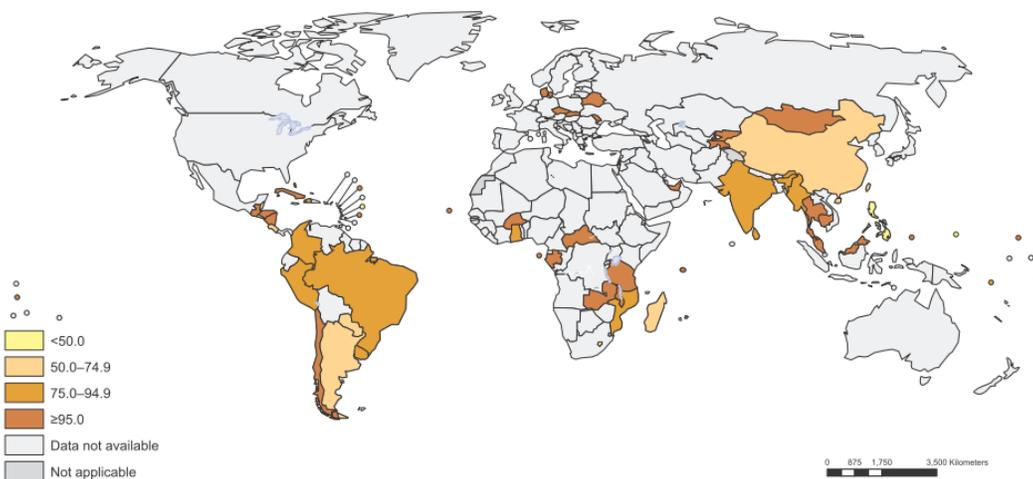


Figura 5: Porcentaje de embarazadas seropositivas a las que se les realizó el tratamiento apropiado para sífilis. Fuente: WHO Global Health Observatory Data Repository (<http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>).

En Uruguay, desde el año 1986 rige una norma que obliga a la investigación serológica de infección por sífilis a través de la realización del examen VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*) a la embarazada en el primer trimestre y antes de la semana 32 de gestación, así como también a todos los recién nacidos (Ppits, 2010). A partir del año 2005, se incluye a la sífilis dentro de las enfermedades de notificación obligatoria (Ppits, 2010), lo cual comprende la notificación tanto de casos confirmados como sospechosos. Desde ese año, se viene detectando un incremento en el porcentaje de mujeres embarazadas con sífilis a nivel nacional, llegando a un máximo en el año 2010. A partir de ese año, comienzan a disminuir el porcentaje de casos hasta permanecer estable entre el período de 2012 y 2013 (**Figura 6**).

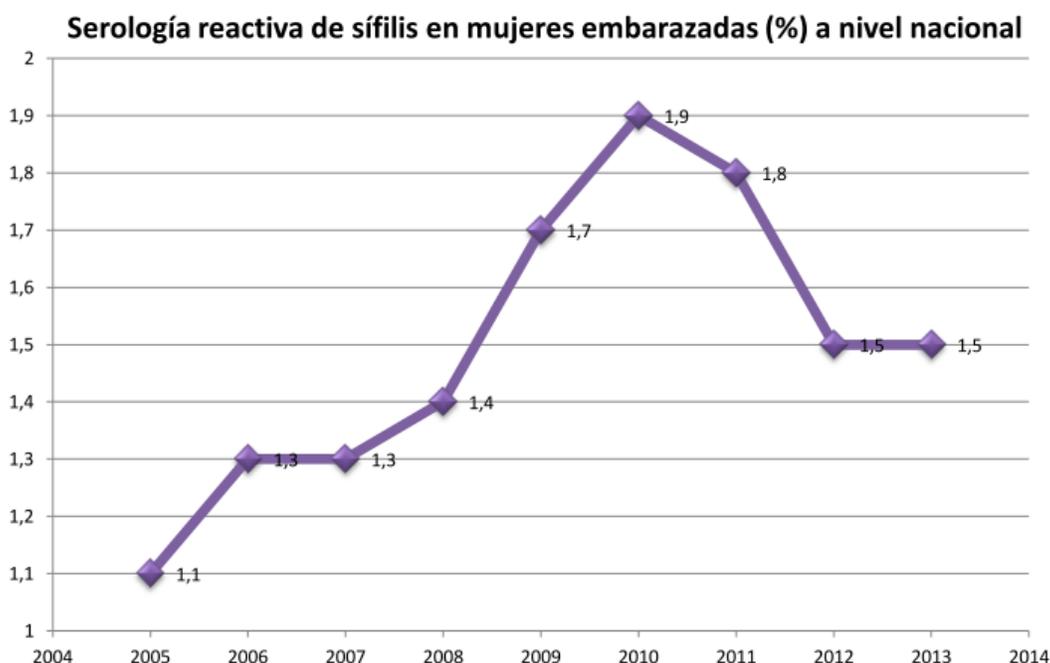


Figura 6: Porcentaje de mujeres embarazadas con serología reactiva de sífilis a nivel nacional en el período comprendido por los años 2005 a 2013. Fuente: Sector ITS/SIDA.

En 2007 se constituye una comisión interdisciplinaria integrada por representantes de los programas Salud de la Niñez, Programa ITS/SIDA, Programa mujer y género, técnicos del Centro Hospitalario Pereira Rossell, cátedras de Ginecología, Obstetricia y Neonatología de la Facultad de Medicina, ginecólogos, dermatólogos, neonatólogos, pediatras, anatomopatólogos, directores de ASSE (Administración de Servicios de Salud del Estado) de la Red de Atención Primaria (Plan Aduana) e integrantes de la Unidad de Vigilancia en Salud Pública de la División de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública. En esta comisión se proponen cuatro objetivos para la eliminación de la sífilis congénita:

1. Contar con el compromiso político y asesoría pertinente.
2. Promover la atención prioritaria materno-infantil.
3. Realizar el diagnóstico de sífilis a toda embarazada y a sus parejas sexuales.
4. Fortalecer la vigilancia epidemiológica de casos de sífilis materna, de probables sífilis congénita, abortos y muertes.

2.4 Métodos de diagnóstico de Sífilis

Actualmente existen dos tipos de métodos de diagnóstico de sífilis: los métodos directos y los indirectos. Dentro de los métodos directos se encuentra la visualización de la espiroqueta a partir de lesiones cutáneas por microscopía de campo oscuro y microscopía de fluorescencia, así como también la detección por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) del ácido nucleico de la bacteria a partir de muestras provenientes de lesiones cutáneas y también de fluidos corporales. Si bien todas ellas presentan ventajas, la principal desventaja de estos métodos es el requerimiento de equipos costosos y de personal altamente entrenado para la interpretación de los resultados, y que sobre todo en la visualización de la espiroqueta por microscopía, la eficacia del diagnóstico recae mucho en la interpretación realizada sobre los resultados.

Los tests serológicos forman parte de los métodos indirectos más utilizados. Entre éstos se encuentra los denominados test no-treponémicos y los tests treponémicos. La diferencia radica en que los primeros detectan la presencia de anticuerpos desarrollados contra lípidos liberados por las células del huésped dañadas por la presencia de la bacteria, así como también contra material lipoproteico de la propia bacteria. Por otro lado, en los tests treponémicos se detectan anticuerpos que reconocen antígenos propios de la espiroqueta. Los tests no-treponémicos comprenden al test VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*), RPR (*Rapid Plasma Reagin*) y TRUST (*Toluidine Red Unheated Serum Test*). Son tests sensibles pero de baja especificidad. Por esto se han desarrollado los tests treponémicos, entre los cuales se encuentran FTA-ABS (*Fluorescent Treponemal Antibody Absorbed*), TP-PA (*Treponema pallidum Particle Agglutination*) y TPHA (*Treponema pallidum Hemagglutination Assay*). Estos tests específicos de treponema utilizan lisados o una mezcla de antígenos recombinantes de *T. pallidum*.

Los tests serológicos de sífilis pueden dar falsos negativos cuando en el paciente coexiste otro tipo de problemas de salud, como derivados de otras espiroquetas, desórdenes autoinmunes o VIH. Es por ello que el uso de un solo método de diagnóstico de sífilis es considerado insuficiente para lograr el mejor desempeño diagnóstico y la búsqueda de métodos diagnósticos simples, confiables y económicos aún continúa (Sambri et al., 2001).

Los tests serológicos no-treponémicos más utilizados actualmente, como el VDRL y RPR, son utilizados para el diagnóstico de la sífilis prenatal. Sin embargo, estos a menudo no están disponibles en los establecimientos médicos en países en desarrollo debido al requerimiento de una fuente de electricidad para refrigerar los reactivos, operar una centrífuga para separar el suero de la sangre total y de energía para operar un rotor para realizar la mezcla de la reacción. El requerimiento de almacenamiento en frío, a su vez, limita el volumen de reactivos y tests que pueden ser almacenados en el centro de diagnóstico, llevando frecuentemente al desabastecimiento de stocks en distintos centros de cuidado de la salud (R W Peeling, Holmes, & Mabey, 2006) y por lo tanto a que muchas embarazadas que concurren a realizarse los controles prenatales no puedan realizarse el diagnóstico de sífilis.

La sensibilidad y especificidad de los tests serológicos varían dependiendo del tipo de test y etapa de la enfermedad (**Tabla 1**). A su vez, de acuerdo a la etapa de la sífilis que se esté cursando, el tipo de test recomendado varía como consecuencia del título de espiroqueta presente en la sangre o tejido analizado así como también del perfil y título de anticuerpos presentes en el torrente sanguíneo (**Tabla 2**). Es por ello que muchas veces se requiere de la realización de más de un tipo de test.

Tabla 1: Sensibilidad y especificidad de distintos tests serológicos no treponémicos en las distintas etapas de sífilis. (Ratnam & Fccm, 2005)

Desempeño de tests serológicos para sífilis					
Test	Procentaje de sensibilidad por etapa en sífilis sin tratamiento				Especificidad
	Primaria	Secundaria	Latente	Tardía	
VDRL	78 (74-87)*	100	96 (88-100)	71 (34-94)	98 (96-99)
RPR	86 (77-99)	100	98 (95-100)	73	98 (93-99)
USR	80 (72-88)	100	95 (88-100)		99
TRUST	85 (77-86)	100	98 (95-100)		99 (98-99)
FTA-ABS	84 (70-100)	100	100	96	97 (84-100)
FTA-ABS DS	80 (70-100)	100	100		98 (97-100)
TP-PA	88 (86-100)	100	100		96 (95-100)

*Rango en estudios de Centros para el Control de Enfermedad y Prevención.
 DS Double staining; FTA-ABS Fluorescence treponema antibody absorption; RPR Rapid plasma reagin; TP-PA Treponema pallidum particle agglutination; TRUST Toluidine red unheated serum test; USR Unheated serum reagin; VDRL Venereal Disease Research Laboratory.

Tabla 2: Tests de diagnóstico de sífilis recomendados para cada etapa de la sífilis (Ratnam & Fcmm, 2005).

Aplicación y limitaciones de tests diagnósticos en distintas etapas de la sífilis		
Etapa	Tests Recomendados	Comentarios
Sífilis primaria	Examinación directa, Tests no-treponémicos, Tests treponémicos	La detección de <i>Treponema pallidum</i> en lesiones es evidencia definitiva de sífilis pero un resultado negativo no descarta sífilis. Los tests basados en PCR tienen una alta confiabilidad. En las primeras dos a tres semanas, la serología puede no ser positiva en la mayoría de los casos, y en la sífilis primaria temprana, se recomiendan los tests treponémicos. La presencia de una úlcera genital y un tests no-treponémico positivo puede no ser indicativo de sífilis primaria. Repetir serología luego de un período de dos a 12 semanas para descartar sífilis.
Sífilis secundaria	Examinación directa, Tests no-treponémicos, Tests treponémicos	<i>T pallidum</i> puede ser detectada en lesiones mucosas y de la piel, y los tests basados en PCR pueden ser útiles en lesiones atípicas. Los tests serológicos tienen cerca del 100% de sensibilidad. En personas con historial de sífilis, un aumento de cuatro veces en los títulos confiere un diagnóstico presuntivo de sífilis secundaria.
Sífilis latente	Tests no-treponémicos, Tests treponémicos	Los tests no treponémicos son reactivos en sífilis latente temprana pero la sensibilidad disminuye a lo largo del tiempo. En las poblaciones con baja prevalencia, los resultados falsos positivos son comunes en ambos tipos de tests. Tests treponémicos reactivos en ausencia de un tests no treponémico reactivo requieren de confirmación.
Sífilis terciaria	Tests no-treponémicos, Tests treponémicos	Hasta un 30% puede no ser reactivo en tests no treponémicos, mientras que los tests treponémicos son casi siempre reactivos. Por lo tanto, los tests treponémicos siempre deberían ser consideradas. Las lesiones no son adecuadas para examinación por microscopía directa.
Neurosífilis	Tests no-treponémicos, Tests treponémicos	El diagnóstico requiere una combinación de tests. VDRL-CSF, el tests serológico estándar para CSF, es altamente específico pero insensible. Por lo tanto, un resultado negativo de VDRL-CSF no descarta neurosífilis. Además de un VDRL-CDF reactivo, el diagnóstico depende de tests serológicos reactivos y anomalías en el CSF. FTA-ABS es más sensible que VDRL-CSF pero menos específico. Por lo tanto, el test FTA-ABS de CSF puede ser útil para excluir neurosífilis. Los tests basados en PCR tienen una alta confiabilidad.
Sífilis congénita	Examinación directa, Tests no-treponémicos	El diagnóstico requiere una combinación de tests. Se deben evaluar muestras de sangre tanto de la madre como del hijo. El tests serológico en el suero del niño puede no ser reactivo si la madre tiene un bajo título o fue infectada en las últimas etapas del embarazo. Tests específicos de IgM son útiles para el suero del neonato, pero resultados negativos pueden no descartar sífilis congénita. <i>T pallidum</i> puede ser detectada por examinación directa de una variedad de especímenes del neonato, y los tests basados en PCR tienen una alta confiabilidad.

CSF Cerebroespinal fluid; FTA-ABS Fluorescent treponemal antibody absorption; PCR Polymerase chain reaction; VDRL Venereal Disease Research Laboratory

2.4.1 Tests serológicos no-treponémicos

Entre los tests serológicos no-treponémicos más ampliamente utilizados se encuentra VDRL y RPR, siendo el primero el test de detección de sífilis utilizado en Uruguay. Luego del año o dos de la infección se alcanza un máximo en los títulos de anticuerpos no-treponémicos, que luego disminuye lentamente durante las etapas de infección latente tardía y terciaria, llegando a valores negativos en la etapa muy tardía. Este comportamiento se diferencia de los tests específicos de treponema que a menudo permanecen reactivos por muchos años (Alderete & Baseman, 1981; Sato & Paulo, 1995). Esto hace que los tests no-treponémicos sean utilizados para evaluar la eficacia del tratamiento de sífilis, esperando una disminución significativa en el título de anticuerpos no-treponémicos luego del tratamiento exitoso de sífilis. Sin embargo, si el tratamiento se inicia durante las etapas tardías, puede resultar en seropositivo a pesar del bajo título de anticuerpos presentes en el paciente (Unemo et al., 2013).

Las limitaciones de los tests serológicos no-treponémicos incluyen la falta de sensibilidad en sífilis primaria temprana y sífilis latente tardía, la posibilidad de reacción cruzada o resultados de falsos positivos, como consecuencia de la inespecificidad de estos tests respecto a *T. pallidum* (Larsen, Steiner, & Rudolph, 1995). Por otro lado, existe en este tipo de tests la posibilidad de reacciones cruzadas, las cuales ocurren cuando el anticuerpo está en exceso. Este tipo de reacciones ocurren en 1 a 2% de los pacientes con sífilis secundaria (Sato & Paulo, 1995). A su vez, se han detectado falsos positivos asociados a la condición de salud del paciente, las cuales incluyen edad avanzada, embarazo, adicción a drogas, enfermedades autoinmunes e infecciones virales (hepatitis, mononucleosis infecciosa, neumonía viral, sarampión, entre otras), infecciones por protozoarios (malaria) o micoplasma (Larsen et al., 1995). Por lo tanto, la interpretación de los tests treponémicos no solo tiene que tener en cuenta la etapa de la enfermedad que se esté cursando sino también el estado de salud del paciente con el fin de realizar la interpretación adecuada de los resultados obtenidos.

❖ **Test VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*)**

Este test detecta anticuerpos anti-cardiolipina (IgG, IgM o IgA) a través de la interacción de éstos con el antígeno VDRL (complejo de lecitina, colesterol y cardiolipina), lo cual es visualizado mediante la formación de floculación. Algunos investigadores sugieren que los anticuerpos detectados a través de este test se desarrollan en respuesta a la destrucción de tejido del huésped, la cual se produce durante la fase aguda de la infección por *T. pallidum* (Lukehart, 1986). A medida que la inflamación disminuye como consecuencia de la resolución espontánea de la infección o en respuesta a la terapia, se observa una disminución en el título de este tipo de anticuerpos. Otros investigadores sostienen que *T. pallidum* contiene antígenos tipo cardiolipina (S. Baker-Zander & Sell, 1980) y que es este antígeno solo o en conjunto con cardiolipina de tejido del huésped lo que induce la respuesta en VDRL (Baker-zander, Shaffer, & Lukehart, 1993). Para realizar este test, se necesita calentar el suero (56°C) y la lectura de los resultados se realiza utilizando un microscopio de magnificación de 100X (Unemo et al., 2013).

❖ **Test RPR (*Rapid Plasma Reagin*)**

Al igual que el test VDRL, detecta anticuerpos IgM e IgG contra cardiolipina presente en el suero de pacientes con sífilis. Este test es una modificación de VDRL. La diferencia radica en que el antígeno de RPR contiene cloruro de clorina (para eliminar la inactivación del suero evaluado), EDTA (para potenciar la estabilidad de la suspensión) y partículas de carbón (para la visualización de la suspensión) (Sato & Paulo, 1995). Otra ventaja respecto al test VDRL es que este test puede ser realizado en sueros o plasma sin calentar. Por estas razones es que RPR es el test no-treponémico macroscópico de mayor disponibilidad y

uso alrededor del mundo. Una modificación de RPR, denominada TRUST (*Toluidine Red Unheated-Serum Test*) utiliza rojo de toluidina en lugar de carbón para visualizar la reacción de floculación. A diferencia de los utilizados en RPR, los reactivos utilizados en TRUST no requieren almacenamiento refrigerado (Unemo et al., 2013).

2.4.2 Tests serológicos treponémicos

Los tests serológicos treponémicos son más específicos que los no-treponémicos ya que detectan anticuerpos producidos contra antígenos específicos de *Treponema pallidum*. Aun así, se han detectado falsos positivos cuyas causas son aún desconocidas (Larsen et al., 1995). Algunos tests treponémicos pueden presentar reactividad en etapas más tempranas de infección respecto a los no-treponémicos, sirviendo para el diagnóstico de la enfermedad incluso 3 semanas luego de ocurrida la infección (Unemo et al., 2013). Sin embargo, una desventaja que presentan estos tests es que arrojan resultados positivos durante toda la vida del paciente, incluso luego de haber recibido un tratamiento exitoso, razón por la cual no pueden ser utilizados para monitorear el progreso de un tratamiento.

Los tests treponémicos utilizados actualmente utilizan lisados totales de células de *T. pallidum*, antígenos recombinantes individuales o una mezcla de los mismos para detectar anticuerpos contra componentes celulares específicos de treponema. Al menos 9 polipéptidos de *T. pallidum* con masas moleculares aparentes de 15 (Tpp15), 17 (Tpp17), 33, 37 (Tpp37), 39, 43, 45 (TppA), 47 (Tpp47) y 97kDa, han sido identificados como principales inmunógenos (Blanco et al., 1994; George, 1998; Norris, 1993; Radolf et al., 1995; Rodgers et al., 1986; Wicher, Jakubowski, Wicher, & Centerfor, 1987; Wicher, 1986). Dentro de estos polipéptidos, al menos 5 (Tpp15, Tpp17, Tpp37, TppA y Tpp47) demostraron ser de importancia diagnóstica (Byrne et al., 1992; Larsen et al., 1995; Marangoni, 1999; Norris, 1993). La utilización de antígenos recombinantes presenta muchas ventajas respecto a la utilización de antígenos purificados de *T. pallidum* o de lisados celulares. Una de ellas es evitar las dificultades de la purificación de antígenos a partir de *T. pallidum* debido a la estructura compleja de los antígenos de la espiroqueta, lo cual aumentaría la especificidad de los tests serológicos treponémicos. Además, la producción de antígenos recombinantes podría permitir la producción y caracterización de polipéptidos antigénicos de *T. pallidum* individuales específicos en cantidades ilimitadas, creando de esta forma una fuente consistente e ilimitada de antígenos (Sambri et al., 2001).

Los tests serológicos treponémicos incluyen Inmunofluorescencia indirecta, test de aglutinación (utilizando eritrocitos sensibilizados o partículas de gelatina), ELISAs (variantes con tecnología quimioluminiscente o inmunocromatográfica) o tests POC

(*Point of Care*). Todos estos son altamente específicos y fueron inicialmente diseñados para ser utilizados como tests confirmatorios. Sin embargo, aquellos que pueden ser automatizados, como ELISA, son actualmente utilizados en algunos países como tests de relevamiento (Unemo et al., 2013).

❖ **Test FTA-ABS (*Fluorescent Treponemal Antibody Absorption*)**

Este test ha sido considerado por muchos años como el test treponémico estándar. Utiliza una técnica de anticuerpo fluorescente indirecta. El antígeno utilizado es la propia espiroqueta *T. pallidum subsp. pallidum* (cepa Nichols). El suero del paciente es diluido en un extracto de cultivos de *Treponema reiter* no-patogénico con el fin de remover anticuerpos treponémicos que puedan haber sido producidos contra treponemas no-patogénicos. El suero absorbido es colocado en un porta objetos al cual ha sido fijado *T. pallidum*. Si el suero del paciente contiene anticuerpos, los mismos se unirán a la espiroqueta fijada. Para visualizar esta interacción, se adiciona inmunoglobulina anti-humana marcada con fluoresceína para la posterior examinación por microscopio de fluorescencia. El requerimiento de un microscopio de fluorescencia de buena calidad, experiencia en la interpretación, reactivos de calidad y la realización de una dilución apropiada del conjugado, hacen de este método de detección imposible de realizar en todos los centros de salud. Además, existe una mayor probabilidad de obtener falsos positivos como negativos debido a lecturas subjetivas del test.

❖ **Tests TPHA (*Treponema pallidum Haemagglutination*) y TPPA (*Treponema pallidum Particle Agglutination*)**

Estos tests son más fáciles de realizar que FTA-ABS y son similares en cuanto a la sensibilidad. Además, tienen la ventaja de ser automatizables, razón por la cual han sustituido a FTA-ABS como estándar de referencia (Unemo et al., 2013). El test TPHA detecta anticuerpos reactivos que aglutinan glóbulos rojos sensibilizados con antígeno de *T. pallidum*. Eritrocitos de oveja o pavo son sensibilizados con antígeno ultrasonificado de *T. pallidum* (cepa Nichols). El suero del paciente es primero mezclado con diluyentes hechos de treponema no patogénico y otros estabilizadores. La reacción es llevada a cabo en microplaca. Los sueros que contienen anticuerpos reaccionan con estas células para formar una capa de células aglutinadas. Por otro lado, el test TPPA utiliza partículas de gel biológicamente inertes coloreados en lugar de glóbulos rojos y presenta menos reacciones inespecíficas que TPHA.

❖ **EIA (Inmunoensayo Enzimático Treponémico)**

La sensibilidad de EIA es comparable con aquellos de FTA-ABS y ensayos de aglutinación. La mayoría de los EIAs utilizan ya sea antígeno de *T. pallidum* sonificado [*Captia Syphilis G* (Trinity Biotech), *Enzygnost Syphilis* (Dade Behring), *Bioelisa Syphilis* (Biokit)], un único antígeno recombinante de treponema, o una mezcla de antígenos recombinantes que recubren los pocillos de microplacas [*ICE Syphilis* (Murex), *Trep-Chek* (Phoenix), *Trep-Sure* (Phoenix)]. Una dilución de suero es adicionada a cada pocillo. Si los anticuerpos específicos para *T. pallidum* están presentes en el suero del paciente, se unirán a los antígenos de treponema. Posteriormente, un conjugado que comprende IgG anti-humano biotinilado de cabra marcado con estreptavidina-peroxidasa es adicionado para detectar anticuerpos unidos de forma específica. Luego se adiciona un sustrato enzimático para detectar el conjugado antígeno-anticuerpo, llevándose a cabo una reacción coloreada si el paciente tiene anticuerpos contra antígenos de *T. pallidum*. La intensidad de desarrollo de color es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos presentes, leyéndose el cambio de color utilizando un lector de placa. En algunos EIAs se utiliza un enfoque diferente. Antígenos recombinantes específicos de treponema de 15, 17, 44.5 y 47kDa conjugados a HRP (*Horseradish peroxidase*) son inmovilizados en pocillos de microplaca. El suero del paciente es adicionado a los pocillos y si están presentes los anticuerpos anti-treponema se unirán específicamente a los antígenos inmovilizados. Los mismos antígenos recombinantes conjugados a HRP son luego adicionados a los pocillos de la placa. Al adicionar un sustrato de peroxidasa cromogénico, se mide el cambio de color espectrofotométricamente. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el suero del paciente. Como resultado de esta configuración, la especificidad y sensibilidad de este test son superiores a los de aquellos ELISAs de primera generación.

❖ **Ensayo por *Western blot* de *Treponema***

En el ensayo por *Western blot* de *Treponema*, proteínas de *T. pallidum* solubilizadas (obtenidas de lisados celulares) son separadas por electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) de acuerdo a su peso molecular. Las proteínas separadas son luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa que es secada y cortada en tiras. Luego de incubar las mismas con el suero del paciente, los complejos antígeno-anticuerpo son visualizados adicionando IgG o IgM anti-humano conjugados a fosfatasa alcalina y la posterior adición del sustrato para esta enzima que generará una reacción de color. La detección de anticuerpos frente a los antígenos de treponema correspondiente a masas moleculares de 15, 17, 44.5 y 47kDa se consideran positivos. Los criterios que comprenden la reactividad de estos antígenos ha resultado ser contradictorio.

Un estudio realizado por (George, 1998) encontró que la reactividad con el antígeno de 17kDa es la más sensible y específica para detectar la sífilis mediante este ensayo, mientras que según (Backhouse & Nesteroff, 2001) el criterio más sensible y específico sería la reactividad con el antígeno de 15kDa y otros dos de los tres principales antígenos de 17, 44.5 y 47kDa. El criterio se basó en el análisis de que Tpp15 tenía una especificidad y sensibilidad del 100%, mientras que las sensibilidades para Tpp17, Tpp44.5 y Tpp47 fueron de 96%, 100% y 100%, respectivamente, mientras que las especificidades fueron del 100%, 96% y 20%, respectivamente. Actualmente existen ensayos de *Western blot* para *T. pallidum* utilizando antígenos recombinantes en lugar de proteínas obtenidas a partir de lisados celulares, los cuales incluyen a *Treponema Virablot IgG* (Viramed Biotech) e *INNO-LIA Syphilis test* (Innogenetics). El ensayo *Treponema Virablot IgG* utiliza a los antígenos recombinantes Tpp15, Tpp17, Tpp44.5 y Tpp47. En comparación con los resultados obtenidos a partir de RPR, FTA-ABS y TPPA, la sensibilidad del mismo es de 95.5% y la especificidad de 97.8% (Welch & Litwin, 2010). El otro ensayo, *INNO-LIA Syphilis test* es un inmunoensayo que utiliza los antígenos recombinantes Tpp15, Tpp17 y Tpp47 junto con un péptido sintético derivado de Tpp44.5 (TppA). La sensibilidad de este ensayo resultó ser del 99.6% y la especificidad del 99.5% (Ebel et al., 2000).

❖ **Test POC (*Point of Care*)**

Los tests del tipo "*Point of Care*" tienen muchas ventajas respecto a los comúnmente utilizados RPR y VDRL. Una de ellas es que no requieren de ningún equipamiento para su realización ni de reactivos que deban ser refrigerados, así como tampoco de laboratorios con personal entrenado. A su vez, pueden realizarse utilizando sangre obtenida de un pinchazo en el dedo (Herring, 2006), aunque se ha demostrado que la utilización de suero presenta una mayor sensibilidad (Herring, 2006; Li et al., 2009). La lectura de los resultados se realiza en aproximadamente 15-20 minutos, lo cual representa una enorme ventaja ya que en la misma consulta médica frente a resultados positivos ya se puede comenzar el tratamiento. Aun así, la implementación de estos tests requiere de una supervisión por un laboratorio de referencia (Sato & Paulo, 1995; Unemo et al., 2013).

El uso de estos tests para el relevamiento de la sífilis durante el embarazo demostró ser extremadamente costo efectivo y por ello han emergido como componente clave de la estrategia de la OMS para la eliminación global de la sífilis congénita (Schmid, Ms, Stoner, Hawkes, & Broutet, 2007).

Actualmente existen muchos fabricantes de este tipo de tests en el mundo. Estos tests son generalmente diseñados como tiras reactivas de flujo lateral o como dispositivos de flow-through. En uno de los formatos de flujo lateral se

distinguen 4 etapas (ver **Figura 7**). La etapa 1 consiste en la adición de la muestra (sangre, plasma o suero) en la almohadilla de muestra. En la etapa 2, los anticuerpos anti-treponema presentes en la muestra fluyen hacia la almohadilla en la cual se encuentran los antígenos recombinantes de treponema conjugados a oro coloidal formando complejos antígeno-anticuerpo. En la etapa 3, éste complejo interacciona con los antígenos de treponema fijados en la denominada línea de test a través de aquellos sitios de los anticuerpos anti-treponema que quedaron sin conjugarse, y cuando se acumula suficiente antígeno marcado esta región se vuelve visible. Finalmente, en la etapa 4 el conjugado antígeno-oro coloidal libre se combina con anticuerpos anti-treponema fijados en la denominada línea de control (Diaz et al., 2004; Rosanna W Peeling & Ye, 2004; Zarakolu, Buchanan, Tam, Smith, & Hook, 2002). En el formato de flow-through, spots de antígeno reemplazan las líneas y la unión de anticuerpos específicos a los antígenos ocurre durante el pasaje a través de la membrana en lugar de pasar lateralmente a lo largo de la tira de membrana.

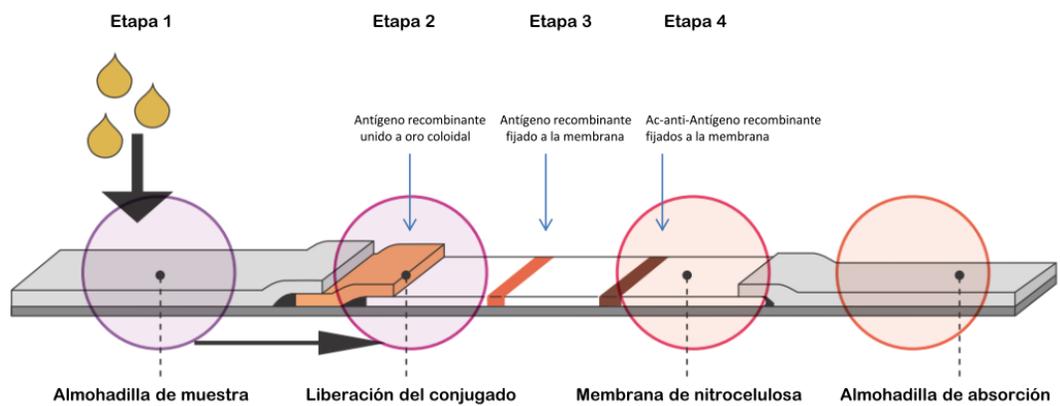


Figura 7: Representación de un diseño de tira reactiva para la detección de sífilis y sus distintos componentes. Modificado de (Healthcare & Sciences, 2013).

La relevancia que está cobrando este tipo de tests va en aumento con los años por las ventajas que presenta, tal cual se mencionó anteriormente. Es por ello que resulta crucial la evaluación de la especificidad y sensibilidad de los distintos tests comerciales actualmente disponibles. En el año 2015, (Bocoum et al., 2015) se evaluaron cuatro tests POC disponibles en el mercado comparando sus características así como especificidad y sensibilidad. En la **Tabla 3** se recogen estos resultados. La especificidad y sensibilidad de los mismos fueron comparadas con las del ensayo TPHA.

Tabla 3: Resultados del análisis de la especificidad y sensibilidad de cuatro tests POC llevados a cabo por (Bocoum et al., 2015).

Ensayo	Antígeno recombinante	Volumen de muestra	Especificidad	Sensibilidad
Determine Syphilis TP (Abbott)	Tpp47	50µL	92.4-100% (suero/plasma) >97.7% (sangre)	93.7-99.2% (suero/plasma) 85.9-95% (sangre)
SD BioLine Syphilis 3.0 ICS (Standard Diagnostics)	Tpp15 Tpp17 Tpp47	10µL (suero/plasma) 20µL (sangre)	94.9-97.8% (suero/plasma) 95.5-99.4% (sangre)	94.2-95% (suero/plasma) 90.2-95.5% (sangre)
Visitec Syphilis (Omega Diagnostics)	Tpp17 Tpp47	25µL (suero/plasma) 50µL (sangre)	98-99.1% (suero/plasma) 99% (sangre)	84.2-98.2% (suero/plasma) 77.9-98.2% (sangre)
Qualpro Syphicheck-WB rapid syphilis test (Qualpro Diagnostic)	Tpp17 Tpp47	25µL (suero/plasma) 50µL (sangre)	93.7-98.9% (suero/plasma) 99% (sangre)	84.5-95.3% (suero/plasma) 70.8-97.6% (sangre)

2.4.3 Uso apropiado de los tests serológicos para Sífilis

Actualmente existen dos enfoques utilizados para el diagnóstico serológico de sífilis: el algoritmo tradicional y un segundo algoritmo comúnmente referido como algoritmo de secuencia reversa (**Figura 8**).

Algoritmo tradicional

Tradicionalmente, la evaluación serológica de sífilis se realiza utilizando un ensayo de sífilis no-treponémico como RPR y VDRL. En caso de obtener resultados positivos, los mismos son confirmados utilizando un tests serológico de sífilis específico como TPPA o FTA-ABS. Este tipo de algoritmo es costo-efectivo para pequeños laboratorios que manejan bajos volúmenes de muestras. Algunos laboratorios prefieren utilizar el ensayo VDRL como el test de relevamiento, sin embargo, la sensibilidad puede llegar a ser menor, especialmente en casos de sífilis primaria (Morshed & Singh, 2015).

Algoritmo de secuencia reversa

Debido a la necesidad del relevamiento de altos volúmenes de muestras, muchos laboratorios han cambiado su enfoque de diagnóstico utilizando ensayos del tipo EIA que utilizan proteínas recombinantes de treponema de 15, 17, 45.5 y 47kDa en forma individual o en combinación (Morshed & Singh, 2015). Las muestras positivas son luego confirmadas utilizando un test serológico no-treponémico cuantitativo como RPR o VDRL. Si los resultados no concuerdan, la muestra es luego evaluada utilizando un segundo test serológico treponémico. Este algoritmo es actualmente aprobado por la Asociación de Laboratorios de Salud Pública, la Agencia de Protección de Salud del Reino Unido, y la Unión Internacional contra las Infecciones de Transmisión Sexual (Egglestone, 2000; Loeffelholz MJ, 2012).

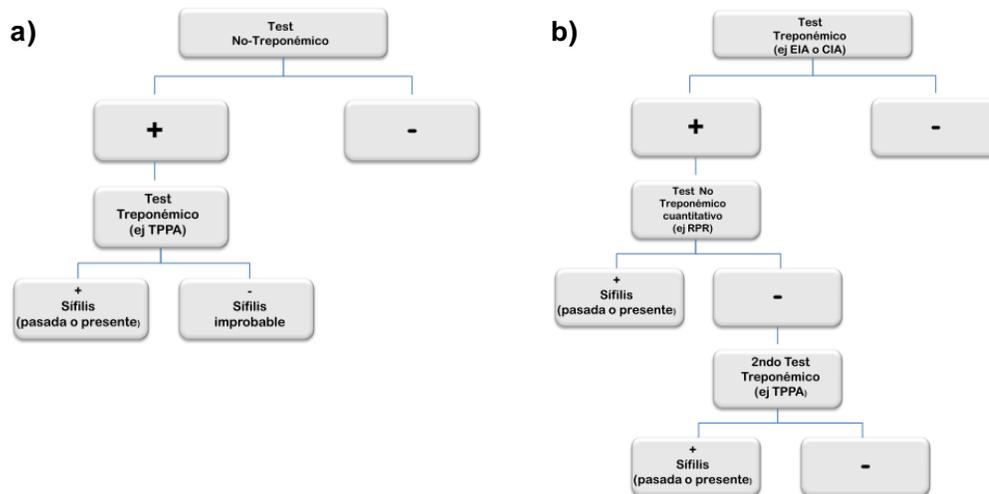


Figura 8: Algoritmos de diagnóstico de sífilis. **a)** Algoritmo tradicional. **b)** Algoritmo de secuencia reversa. Fuente: (Morshed & Singh, 2015).

2.4.4 Diagnóstico de sífilis congénita en el laboratorio

Un test serológico positivo en un recién nacido puede no ser diagnóstico de sífilis, ya que puede ser consecuencia de la transferencia pasiva de anticuerpo materno a través de la placenta durante el embarazo. Es por ello que se establece que para establecer un diagnóstico de sífilis congénita, se requiere encontrar de un título RPR/VDRL significativamente alto (ej mayor o cuatro veces superior) en el suero del recién nacido en comparación con el título materno o la detección de un aumento de este título durante un período de 3 meses.

Si bien las pruebas serológicas pueden ser negativas al momento del nacimiento tanto en madre como hijo, es siempre recomendable realizar un seguimiento luego del parto, ya que de haber contraído la enfermedad en un período cercano al nacimiento se requiere esperar el desarrollo de la respuesta inmune para poder detectar los anticuerpos correspondientes (Fitzgerald, 1989).

2.5 *Treponema pallidum subsp pallidum*

Treponema pallidum pertenece al género *Treponema* de la familia *Spirochaetaceae*. Dentro de la misma, se encuentra la subespecie *T. pallidum pallidum* que es la causante de la sífilis. Esta espiroqueta contiene un único genoma circular de unos 1.140 kb de longitud (McGill et al., 2010; Petrosová, 2013), con un contenido G+C del 52.8% y un total de 1.122 genes de los cuales 1.068 codifican para proteínas, habiéndose identificado la función del 61.6% de las mismas. Al menos 45 genes codifican para lipoproteínas, que en su mayoría no presentan homología estructural o funcional a otras lipoproteínas bacterianas conocidas (Deka et al., 2007). Las proteínas de función conocida tienen un tamaño promedio de 37.7kDa y un pI promedio de 8.1 (McGill et al., 2010). A su vez, se ha detectado la presencia de un gran número de metaloproteínas de unión a zinc, característica importante teniendo en cuenta que es el segundo metal traza más abundante (luego del hierro) en el cuerpo humano y que puede ser absorbido más fácilmente que el hierro de los tejidos humanos y fluidos corporales (Deka et al., 2007).

El primer genoma completo secuenciado corresponde a la cepa Nichols, aislada en 1912 en Washington, D. C. de fluido cerebroespinal de un paciente con neurosífilis (NICHOLS, 1913), la cual fue revisada en 2013 (Petrosová, 2013). Hasta el momento se secuenciaron un total de cinco cepas (ver **Tabla 4**), en las cuales los cambios encontrados no afectan la capacidad de infección de esta bacteria. A su vez, también se encontraron cepas que presentan resistencia a antibióticos, lo cual veremos más adelante.

Tabla 4: Cepas aisladas de *Treponema pallidum subsp pallidum* cuyo genoma ha sido secuenciado. Fuente: (Centurion-Lara et al., 2006).

Cepa	Origen	Año aislamiento
Nichols	Washington, D. C.	1912
Chicago	Chicago, Ill	1951
Mexico A	Mexico	1953
Sea 81-4	Seattle, Wash.	1980
Sea 81-3	Seattle, Wash.	1981

Treponema pallidum tiene una forma helicoidal, con un largo de 6µm a 15µm y un diámetro aproximado a 0.2µm. Es una bacteria altamente móvil que posee una membrana externa frágil que rodea un espacio periplásmico (dentro del cual se encuentran los organelos de motilidad, denominados endoflagelos), un complejo de peptidoglicano (que le confiere estabilidad estructural y al mismo tiempo flexibilidad (J. Liu et al., 2010) y membrana citoplasmática. Debido a su estructura de doble

membrana, *T pallidum* es a menudo considerada como una bacteria gram negativa. Sin embargo, esta analogía se escapa de la realidad, ya que su membrana externa no posee lipopolisacáridos y su membrana interna es considerablemente más frágil que la de las bacterias gram negativas (Radolf et al., 1995). Los flagelos son originados en los denominados motores flagelares ubicados en los dos extremos del organismo, de tal forma que se enrollan alrededor del protoplasma para superponerse en el medio (J. Liu et al., 2010) (ver **Figura 9**). Otra característica que diferencia a *Treponema* de las bacterias gram negativas, es que en su membrana externa tiene una menor densidad de proteínas, lo cual podría ser la explicación de la capacidad que tiene esta espiroqueta de evadir el sistema inmune del huésped (Cox et al., 2010). Es más, las principales proteínas inmunogénicas se encuentran debajo de la membrana externa, inaccesibles a los anticuerpos, ancladas en su mayoría mediante lípidos N-terminales a la cara periplásmica de la membrana citoplasmática.

Treponema pallidum no puede ser cultivada *in vitro*, y por ello para obtener suficiente cantidad de material para su estudio debe ser propagada en testículos de conejos (Lafond et al., 2006) donde tiene un tiempo de duplicación de 30 a 33hs.

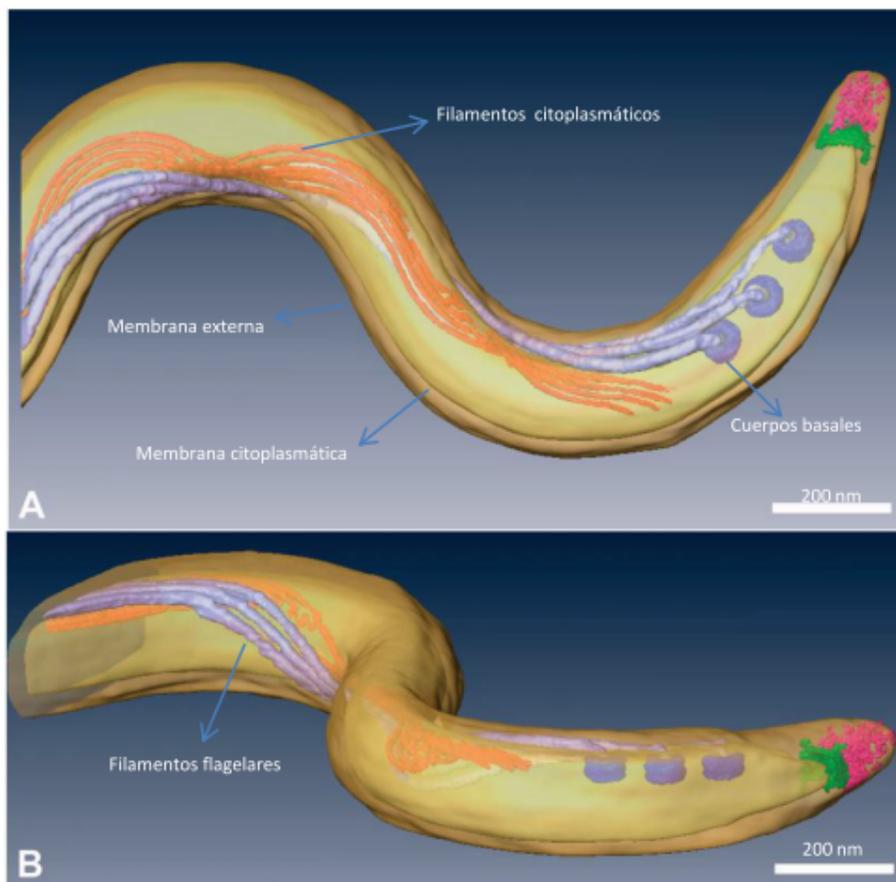


Figura 9: Modelo de la superficie de *Treponema pallidum* obtenida mediante estudios de tomografía crió-electrónica obtenida por (Izard et al., 2009). Vista desde arriba (**A**) y de lado (**B**).

2.6 Patogenicidad y respuesta inmune a *Treponema*

La gran motilidad de *Treponema pallidum* y su capacidad para atravesar distintos tejidos le permiten diseminarse de forma rápida a través de los mismos. Esta espiroqueta presenta la capacidad de penetrar células humanas y de viajar entre compartimentos vasculares y extravasculares, pudiendo moverse a través de tejidos complejos por migración y penetración intracelular, así como también mediante una combinación de estos dos mecanismos (Riviere, Thomas, & Cobb, 1989). Luego de la penetración de la espiroqueta en el sitio de infección, macrófagos y células presentadoras de antígeno (como las células dendríticas) procesan y presentan antígenos de treponema a las células T colaboradoras (CD4+ y CD8+), las cuales posteriormente se encargarán de la secreción de interleuquinas (ej IL-2) para activar la respuesta de células T (Arroll, Centurion-Lara, Lukehart, & Van Voorhis, 1999). A su vez, estas mismas células T colaboradoras se encargarán de inducir el cambio de isotipo de los anticuerpos producidos por las células B que eventualmente permitirán la opsonización de *T. pallidum*, lo cual llevará a la rápida eliminación de la mayoría de las bacterias en el sitio de infección. Sin embargo, mientras ocurren estos procesos, un bajo número de bacterias logra diseminarse a sitios periféricos, lo cual le permitirá persistir con la infección (S. A. Baker-Zander & Lukehart, 1992). Si bien la alta motilidad de *T. pallidum* podría ser una de las causas de evasión del sistema inmune, existen otras teorías para explicar la capacidad de esta espiroqueta de permanecer por largos períodos de tiempo sin ser detectada por el sistema inmune. Una de ellas son el secuestro intracelular de la espiroqueta, la generación de variación antigénica de *T. pallidum*, así como también la capacidad de afectar las defensas del huésped y/o suprimir el inicio de respuestas inmunes efectivas. Otras teorías se basan más en las características estructurales de la membrana externa que contribuirían a la evasión del sistema inmune del huésped (**Figura 10**) (Radolf & Desrosiers, 2009; Radolf, 1994; Salazar, 2002; Salazar et al., 2005).

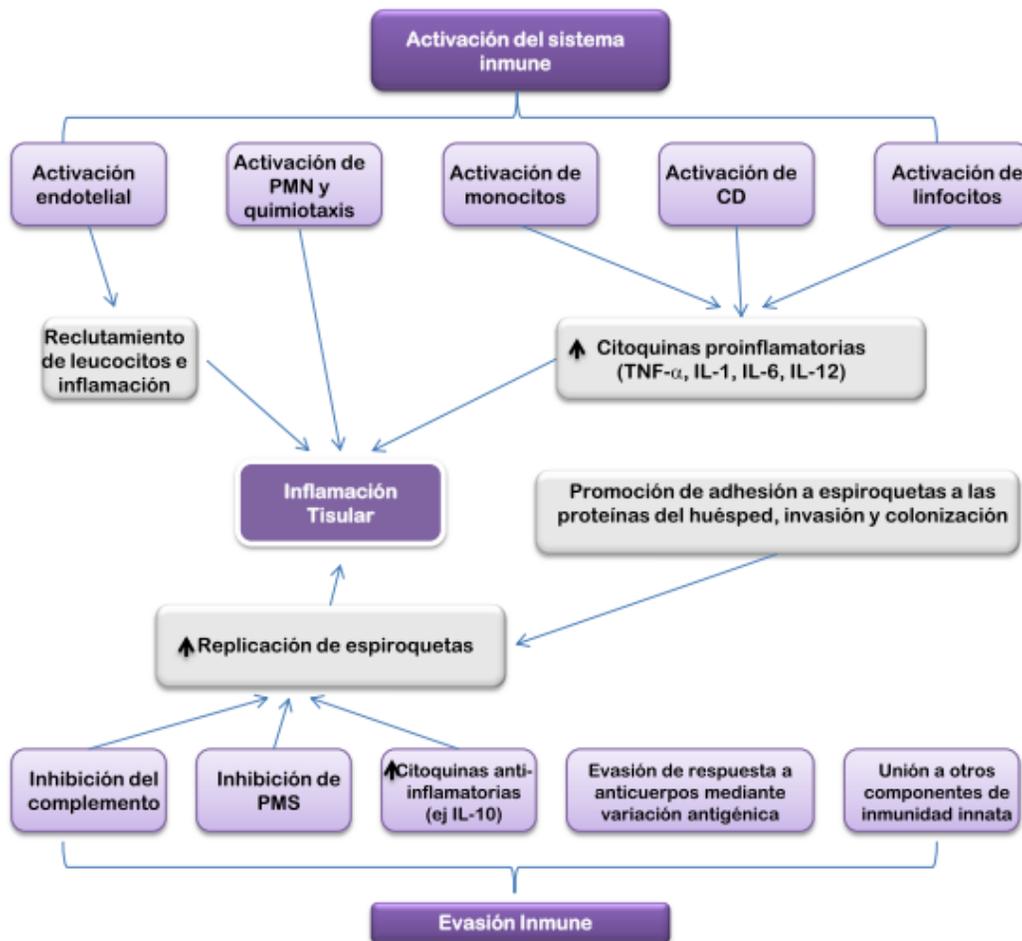


Figura 10: Respuesta inmune generada en el huésped como consecuencia de la infección por *Treponema pallidum*. PMN: Polimorfonucleares, CD: Células Dendríticas. Fuente: (Kelesidis, 2014).

La estimulación temprana de la respuesta inmune celular y humoral es uno de los puntos más importantes de la sífilis. En las etapas primarias de la enfermedad se observa la presencia de anticuerpos anti-fosfolipídicos/anti-cardiolipina, anticuerpos anti-treponemas, así como también anticuerpos contra células sanguíneas, componentes del suero y constituyentes de los tejidos del huésped como fibronectina y colágeno (Wicher, 1990). Las distintas etapas de la sífilis presentan un perfil de inmunoglobulinas característico. La sífilis primaria, se asocia con respuestas IgM e IgG1, mientras que la sífilis secundaria se caracteriza por un incremento en los anticuerpos específicos anti-treponema IgG3. A su vez, incluso luego de realizado un tratamiento exitoso, se observa la persistencia de los anticuerpos anti-treponema IgG1 e IgG3, lo cual podría ser indicativo de la expansión clonal de células de memoria (Baughn, Jorizzo, Adams, & Musher, 1988).

2.6.1 Lipoproteínas y sistema inmune

Treponema pallidum expresa abundantes lipoproteínas de membrana que inducen respuestas inmunes fuertes (Chamberlain, Brandt, Erwin, Radolf, & Norgardl, 1989), pudiendo ocurrir interacciones lípido-lípido entre la espiroqueta y los rafts lipídicos de células de huésped eucariótico a través de glicolípidos (Schroder, 2008) o lipoproteínas (Haake, 2009). Estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que las lipoproteínas de membrana de *T. pallidum* son patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que se unen a receptores de reconocimiento de patrones como los receptores de tipo Toll (TLR) y serían los principales responsables de la evasión del sistema inmune por parte de la espiroqueta así como también de la adhesión de la misma a las células del huésped (Kelesidis, 2014).

Entre las lipoproteínas que demostraron tener actividad antigénica se encuentran las de peso molecular de 15, 17 y 47 kDa (Tpp15, Tpp17 y Tpp47), las cuales se encuentran fijadas a la cara externa de la membrana citoplasmática de treponema mediante palmitoiletanolamina y diacilglicerol unidos covalentemente a un residuo de cisteína N-terminal.

2.7 Lipoproteínas Tpp15, Tpp17 y Tpp47

La lipoproteína más abundante presente en la membrana citoplasmática de *T. pallidum* es Tpp47. Esta presenta una alta inmunogenicidad (Chamberlain et al., 1989; Immunogen et al., 1988; Norgard, Chamberlain, Swancutt, & Goldberg, 1986; Weigel, Brandt, & Norgard, 1992). Tpp15 y Tpp17 están presentes en menores cantidades, pero son también fuertemente inmunogénicas (Akins, Purcell, Mitra, Norgard, & Radolf, 1993; Purcell et al., 1989). A partir de estas observaciones estas proteínas han sido seleccionadas como candidatas para su utilización en el desarrollo de tests diagnósticos de sífilis.

2.7.1 Tpp15

La lipoproteína de *Treponema pallidum* de 15 kDa, Tpp15, está compuesta por 141 aminoácidos, de los cuales los primeros 17 residuos corresponden al péptido señal que lo dirigirá a la cara externa de la membrana citoplasmática (ver **Figura 11**). En el residuo Cys18 es donde ocurre la unión covalente con la región lipídica (formando N-palmitoilelcisteína o S-diacilglicerol cisteína) mediante la cual se ancla a la membrana de treponema. Aunque aún no existen datos experimentales que lo avalen, según el análisis de secuencia aminoacídica, Tpp15 presenta un dominio de unión a FMN (Mononucleótido de Flavina).

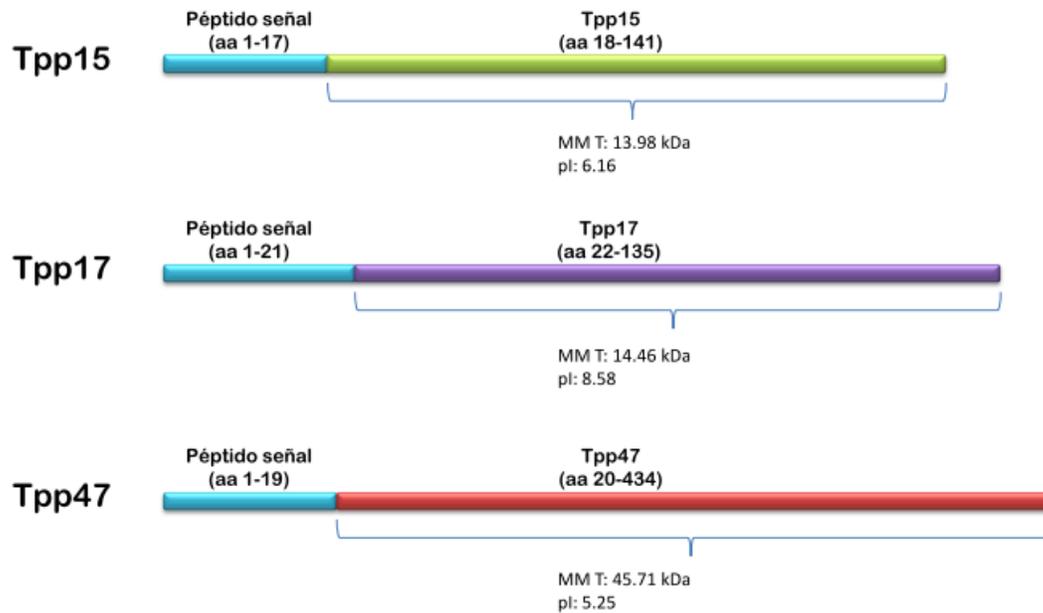


Figura 11: Representación esquemática de las lipoproteínas de *Treponema pallidum* Tpp15, Tpp17 y Tpp47. Los datos teóricos correspondientes a las MMT (masa molecular teórica) y pI fueron obtenidos utilizando la herramienta Protparam del servidor expasy (www.expasy.com).

2.7.2 Tpp17

De forma análoga a Tpp15, la lipoproteína de 17 kDa Tpp17, contiene un péptido señal que abarca los primeros 21 aminoácidos de su secuencia (ver **Figura 11**), ocurriendo el mismo tipo de modificaciones lipídicas que en Tpp15 en el residuo Cys22. En cuanto a su actividad inmunogénica, se ha demostrado que la activación por parte de la región proteica de Tpp17 del sistema inmune del hospedero se asocia a una mayor expresión de moléculas de adhesión, inducción de actividad quimiotáctica de células THP-1 y migración de estas células a través de las monocapas celulares endoteliales estimuladas (Zhang, Wang, Zhang, & Yang, 2015). A su vez, se ha demostrado que tiene la capacidad de estimular la producción de TNF- α por parte de los macrófagos (Akins et al., 1993). Recientemente, Brautigam et al. (2015) reportaron la estructura cristalográfica de Tpp17 recombinante (ver **Figura 12**). En este estudio, también se propone que esta lipoproteína podría estar formando un homodímero mediante el residuo Cys22 para cumplir su función (la cual sigue sin ser elucidada).

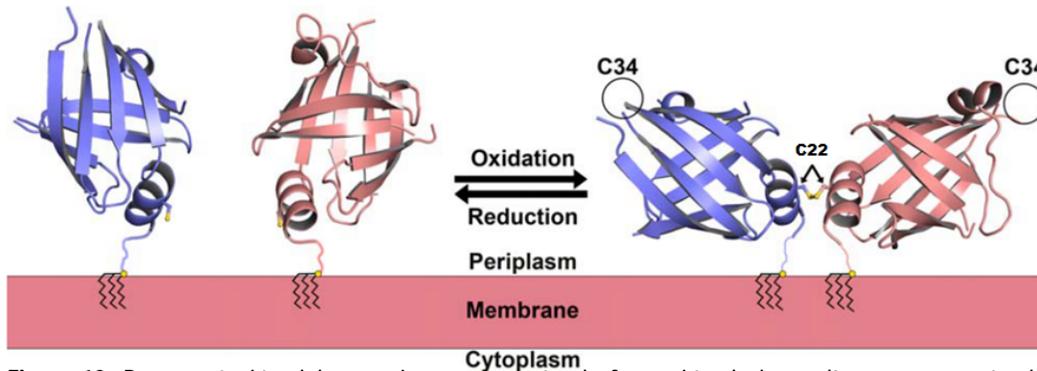


Figura 12: Representación del mecanismo propuesto de formación de homodímeros por parte de Tpp17 en la membrana de *Treponema pallidum*. Fuente: (Brautigam, Deka, Liu, & Norgard, 2015).

2.7.3 Tpp47

La lipoproteína de 47kDa de *Treponema pallidum*, Tpp47 (**Figura 11**), ha sido de las más estudiadas. Esto se debe a diversos reportes que afirman que es uno de los mayores componentes antigénicos debido a que es un marcador confiable de las infecciones de sífilis; es capaz de iniciar una respuesta humoral temprana luego de los 3 a 6 días de la infección; los anticuerpos anti-Tpp47 se encuentran en todas las etapas de la sífilis y la disminución de anticuerpos anti-Tpp47 en respuesta al tratamiento hace de este un buen candidato como marcador terapéutico (Miranda & Sato, 2008). La notable antigenicidad puede ser explicada entre otras cosas por su capacidad de inducir la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6, y de la activación de la vía de señalización del receptor de tipo Toll 2 (TLR2) y de CD14 (S. Q. Liu et al., 2010).

Lo que más ha llamado la atención de esta lipoproteína es que posee actividad β -lactamasa (Cha, Ishiwata, & Mobashery, 2004), a pesar de tener una estructura diferente a las distintas familias de β -lactamasas conocidas. Por ello, si bien se cuenta con la estructura cristalográfica y se ha estudiado por mutagénesis dirigida con el fin de localizar su sitio activo (Deka et al., 2002), aún se desconoce si la actividad catalítica es similar a la de las β -lactamasas conocidas o es parte de un nuevo tipo de β -lactamasa. Más desafiante aún, es explicar cómo una bacteria que contiene en su membrana una lipoproteína con actividad β -lactamasa, sigue siendo susceptible al tratamiento con antibióticos β -lactámicos como lo es la Penicilina.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

La sífilis, enfermedad de transmisión sexual que fue perdiendo relevancia porque se entendía resuelta, por disponer de tratamientos simples y efectivos con penicilina, en los últimos años ha recobrado la atención debido al significativo aumento que se registra en el mundo. De principal interés en Uruguay, es el aumento de casos de sífilis congénita, principalmente en poblaciones vulnerables desde el punto de vista socioeconómico. En este contexto, el objetivo de este trabajo es contribuir al desarrollo de tests de sífilis que permitan un diagnóstico sensible, confiable y de bajo costo que pueda ser empleado directamente en las consultas médicas, sin necesidad de un laboratorio, con especial énfasis en contribuir a la disminución de la sífilis congénita en Uruguay.

Más específicamente, en este proyecto nos proponemos producir las proteínas Tpp15, Tpp17 y Tpp47 de *Treponema pallidum* (agente causante de la sífilis) en *E. coli* para el desarrollo de test de diagnóstico de sífilis.

3.2 Objetivos específicos

Para alcanzar los objetivos mencionados, proponemos:

- 1-Optimizar la expresión de los antígenos Tpp15 y Tpp47 de *Treponema pallidum* en *E. coli* mediante la evaluación de distintas condiciones de cultivo, así como también de construcciones plasmídicas, con el fin de obtener cantidades de antígeno suficientes.
- 2-Optimizar la purificación de las proteínas recombinantes mediante IMAC Ni-NTA.
- 3-Expresar y purificar el antígeno Tpp17 de *Treponema pallidum*.
- 4-Evaluar diferentes condiciones de almacenamiento (composición de buffer y temperatura) de Tpp15 y Tpp47, que permitan el establecimiento de las condiciones óptimas.
- 5-Evaluar la reactividad de Tpp15, Tpp17 y Tpp47 frente a sueros de pacientes que hayan presentado reactividad frente a tests establecidos.

4. Materiales

4.1 Plásmidos

Las secuencias utilizadas para las tres lipoproteínas expresadas, Tpp15 (Gene ID: 2611353), Tpp17 (Gene ID: 2610960) y Tpp47 (Gene ID: 2611716), corresponden a las secuencias proteicas sin el péptido señal N-terminal. Las mismas corresponden a la cepa Nichols de *Treponema pallidum subsp pallidum*. En todos los casos, se adicionaron las bases necesarias para la codificación de 6 histidinas C-terminales.

4.1.1 pUC57

Utilizado para clonar la secuencia de Tpp15 (**Anexo A1.1 y A1.3**) y Tpp47 (**Anexo A1.2 y A1.3**) que fueron optimizadas y sintetizadas por Gen Script. En ambos casos, se adicionaron secuencias homólogas a pET22b(+) tanto en el extremo 5' como 3' para realizar el clonado utilizando enzimas de restricción en el caso de Tpp15 (NdeI y BamHI) y mediante recombinación homóloga en el caso de Tpp47opt.

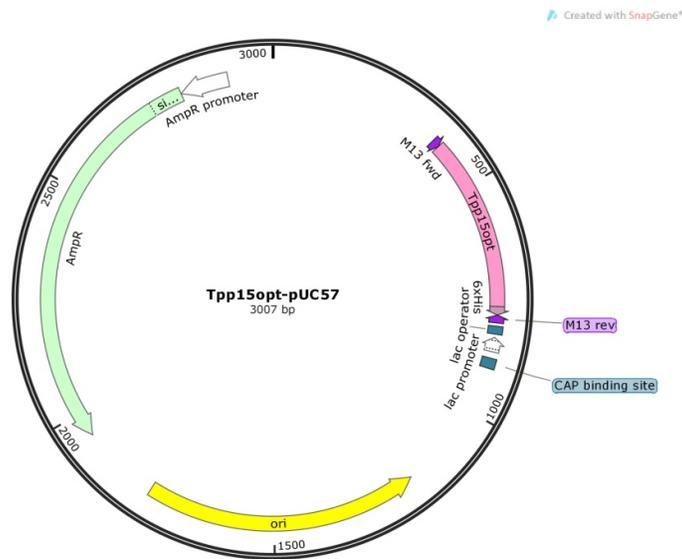


Figura 13: Esquema de la secuencia codificante de Tpp15opt sintetizada por GenScript, clonada en el vector pUC57. Software: SnapGene.

4.1.2 pET22b(+)

Utilizado para clonar la secuencia de Tpp15 (wt y la secuencia optimizada, opt), Tpp17wt y Tpp47opt, para la expresión de las proteínas. La expresión de proteínas en este plásmido se encuentra bajo la regulación del promotor T7 y el marcador de selección que posee es resistencia a Ampicilina.

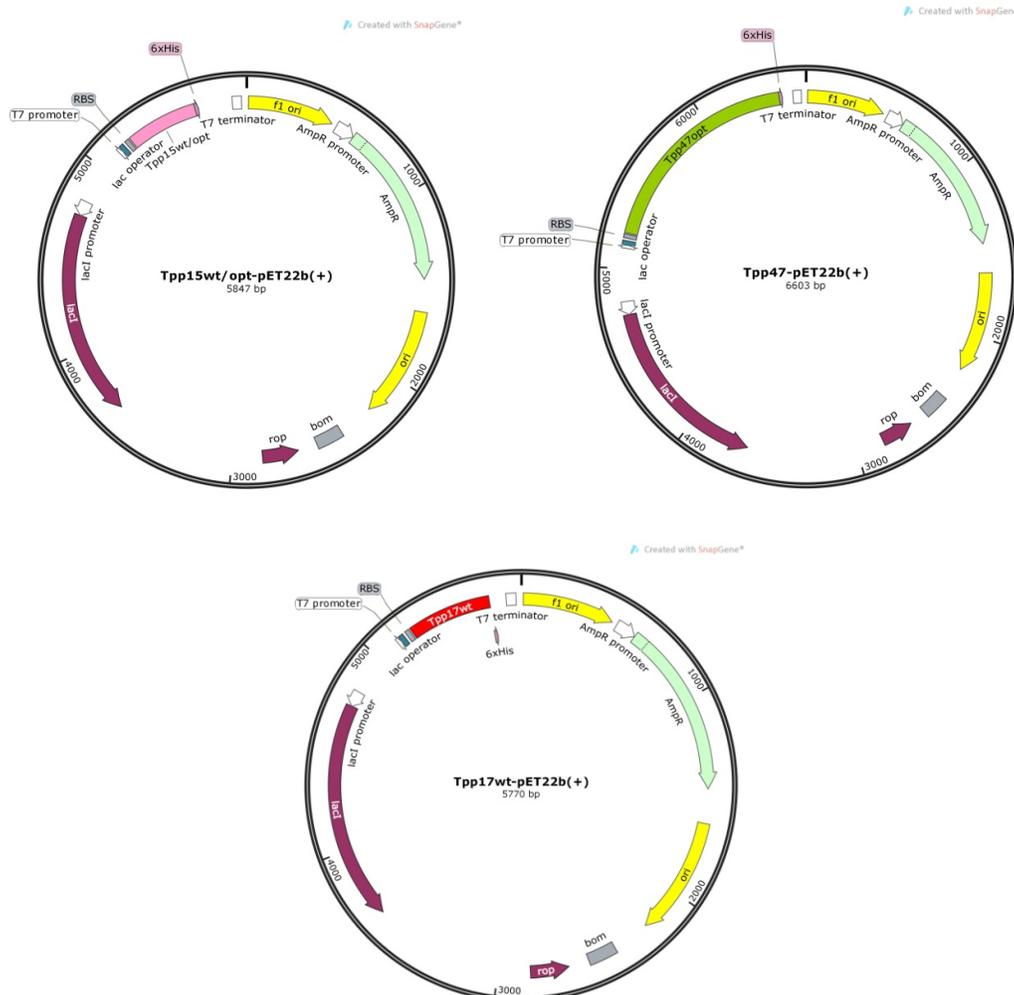


Figura 14: Esquema de las construcciones de Tpp15wt/opt, Tpp17wt y Tpp47opt en pET22b(+). Software: SnapGene.

4.2 Cepas de *E. coli*

4.2.1 DH5 α (Invitrogen)

Utilizada para la amplificación de DNA plasmídico de pET22b(+)-Tpp15opt y pET22b(+)-Tpp47opt. Esta cepa permite alcanzar una alta eficiencia de transformación gracias a las mutaciones endA1 y reA1, asociadas a una menor degradación por endonucleasas y a una menor recombinación homóloga, respectivamente.

4.2.2 BL21(DE3)Star (Invitrogen)

Utilizada para la expresión de Tpp15opt, Tpp15wt, Tpp17wt y Tpp47opt en pET22b(+). Esta cepa fue modificada para la expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor T7. A su vez, incluye una mutación en el gen de RNAsa E que reduce el nivel de expresión de RNAsas endógenas, incrementando la estabilidad de los mRNA.

4.3 Medios de cultivo

4.3.1 Medio Luria Broth (LB)

4.3.2 Medio Autoinductor ZYM-5052 (Studier, 2005)

4.4 Anticuerpos

El anticuerpo primario (anti-his tag) utilizado fue Mouse anti-His Antibody (General Electric) en una dilución 1/3.000, mientras que el anticuerpo secundario fue el anticuerpo conjugado a HRP Anti-Mouse IgG-Peroxidase antibody (Sigma Aldrich) en una dilución 1/2.500.

5. Métodos

5.1 Construcción de plásmidos

5.1.1 Clonado de secuencias en pET22b(+)

Las secuencias codificantes fueron clonadas en pET22b(+) en los sitios de restricción *Nde*I y *Bam*HI. Luego de la digestión del plásmido que contiene la secuencia codificante de la proteína y del plásmido pET22b(+), realizada a 37 °C toda la noche, se purificaron los fragmentos correspondientes a partir de geles de agarosa al 1 % en buffer TAE 0,5X utilizando el kit comercial GeneJET Gel Extraction kit, Thermo Scientific (Cat #: K0691). La ligación de los fragmentos purificados se realiza con la T4 DNA Ligasa (New England Biolabs) incubando a 4 °C toda la noche. Se realiza la transformación con el producto de la ligación, en células *E. coli* DH5 α quimicompetentes, en placas LB, ampicilina. Luego los plásmidos se purifican y se secuencian.

5.1.2 Reacción de amplificación de Tpp15opt

La amplificación de Tpp15opt para confirmar la presencia de ese inserto en pET22b(+) se realizó utilizando la enzima U-Taq DNA polymerase (Sbs Genetech). En un volumen de reacción de 25 μ L, en el Buffer de reacción U-taq 10X, se incluyen dNTPs 10 mM, primer forward (5'-CCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGG-3') y reverse (5'-CTCAGCTTCCTTTCGGGCTTTG-3') 10 mM, ADN (0,6 ng) y H₂O c.s.p. 25 μ L. La reacción incluye una incubación inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, *annealing* a 55 °C por 15 segundos, extensión a 72 °C por 1 minuto y una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

5.1.3 Electroforesis en gel de Agarosa

Se realizan geles de agarosa al 1 % en buffer TAE 0,5X y adicionando el agente intercalante GelRed (BIOTIUM, Cat #: 41003).

5.1.4 Transformación de células quimicompetentes (DH5 α y BL21)

La incorporación de los plásmidos en las cepas de *E. coli* utilizadas se realiza mediante la transformación de 100 μ L de células quimicompetentes, por los métodos habituales (Ausubel et al., 2003).

5.1.5 Amplificación y extracción de ADN plasmídico

La amplificación de ADN plasmídico se realiza a partir de un cultivo bacteriano de 3 mL en medio LB+Ampicilina 100 μ g/mL a 37 °C toda la noche. La posterior extracción de los plásmidos es realizada mediante el método de lisis alcalina (Ausubel et al., 2003).

5.2 Expresión y purificación de proteínas

5.2.1 Expresión de proteínas

La expresión de proteínas se realizó en el medio autoinductor ZYM-5052 evaluando distintas temperaturas y tiempos (37 °C toda la noche, 30 °C toda la noche, 20 °C 20 horas) a 200 rpm. En el caso de la expresión a 20 °C por 20 horas, previamente se realiza el cultivo a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 1, tiempo en el cual se estima que el consumo de glicerol en el medio es completo.

5.2.2 Fraccionamiento de proteínas Soluble / Insoluble

El cultivo celular es centrifugado a 5.520 x g a 4 °C por 15 minutos. Se recupera el sedimento y se determina el peso húmedo de células obtenido. Se resuspende el sedimento en buffer de lisis según la relación 5 mL de buffer por cada gramo de células. La ruptura celular es realizada mediante ultrasonido, utilizando un sonicador (Sonic Ruptor 250, OMNI International) con los siguientes parámetros: 50 % de amplitud, 40 pulsos por minuto, realizando tres rondas de 10 minutos cada una con pausas de 5 minutos entre rondas. Posteriormente, se centrifuga a 20.400 x g a 4 °C por 30 minutos. El sobrenadante obtenido contiene la fracción de proteínas solubles del extracto. El precipitado, correspondiente a la fracción de proteínas insolubles, es lavado tres veces con buffer de lisis y luego se resuspende en el mismo volumen utilizado para resuspender el sedimento inicial con buffer de lisis y la concentración elegida del agente caotrópico (Urea o Hidrocloruro de guanidinio, GndCl).

5.2.3 Estrategias de renaturalización

Método A: Renaturalización en columna

La fracción insoluble de proteínas resuspendida en urea 2 M en Tris-HCl 20 mM pH 8 es diluida hasta una concentración de 1 mg/mL e incubada toda la noche a 18 °C con agitación. Luego se incuba la muestra con 1 mL de resina de Ni-NTA, se realiza el refolding en columna realizando lavados disminuyendo la concentración de urea (2 M, 1 M, 0,5 M y 0 M).

Método B: Renaturalización por dilución rápida

La fracción insoluble de proteínas se disuelve en Cloruro de Guanidinio (GndCl) 5 M, Tris-HCl 20 mM pH 8 y luego se adiciona por goteo a un volumen 9 veces superior de buffer Tris-HCl 20 mM pH 8 (Dilución 1/10), con agitación y refrigerado en hielo (ver **Figura 15**). Luego se centrifuga a 20.400 x g a 4 °C por 15 minutos. A partir del sobrenadante (fracción soluble recuperada) se purifica a la proteína por IMAC (cromatografía de afinidad a iones metálicos) utilizando la resina Ni-NTA.



Figura 15: Dispositivo diseñado para el método de renaturalización por dilución rápida.

5.2.4 Purificación por IMAC (Ni-NTA)

Para la purificación de las proteínas se utiliza 1 mL de resina de Ni(II) inmovilizado sobre agarosa derivatizada con ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) (Qiagen) mediante la unión del tag de histidinas a la misma. La columna se lava con 5 volúmenes de H_2O y se equilibra con 5 volúmenes de buffer de equilibración, cuya composición depende de la proteína purificada (especificado en Resultados y Discusión). La adsorción de la proteína es realizada mezclando la resina equilibrada en buffer con la fracción que contiene la proteína de interés y se incuba con agitación a 4 °C por 1 hora. El percolado es desechado y posteriormente se realiza un lavado con 10 mL de buffer. La elución de la proteína se hace con 500 mM de imidazol en el mismo buffer. Se colecta el eluido en fracciones de 1 mL. Tanto la presencia de proteínas luego del lavado como en la elución es monitoreada utilizando reactivo de Bradford.

5.2.5 Desalado

El desalado de las muestras se realiza por cromatografía de exclusión molecular utilizando columnas pre-empaquetadas PD10 de Sephadex G-25 (General Electric Healthcare). Pevio al sembrado de la muestra, las columnas son lavadas y equilibradas con 10 mL de H_2O y buffer, respectivamente. Se siembran 2,5 mL de muestra a desalar y se descarta el volumen desplazado. Posteriormente, la muestra es eluida en 3,5 mL de buffer.

5.2.6 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas es realizada mediante el ensayo de ácido bicinonínico utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay (Cat #: 23225) (Thermo Scientific). Las curvas de calibración se realizan con seroalbúmina bovina (BSA) a las concentraciones de 200, 100, 50, 25 y 0 $\mu\text{g/mL}$. La absorbancia es medida a 570 nm.

5.2.7 Cromatografía de exclusión molecular

Se utilizó una columna HiLoad 16/60 Superdex 200 (General Electric) en un equipo AKTA (General Electric). Se sembraron 2 mL de muestra y se utilizó un flujo de 1 mL/min. Se colectaron fracciones de 1 mL.

5.3 Western blot

Las proteínas son resueltas mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para la transferencia de proteínas se utiliza una membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific) y se transfieren por 1 hora a 400 mA en un dispositivo Mini Trans-Blot Cell (BioRad). El bloqueo se realiza con solución de bloqueo (5 % leche en polvo descremada en TBST (Buffer Tris salino + Tween 20) a 4 °C toda la noche. Se incuba la membrana con el anticuerpo primario por 1 hora a temperatura ambiente. Se realizan 6 lavados de 5 minutos cada uno en TBST y luego se incuba la membrana con el anticuerpo secundario (conjugado a HRP) por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se realizan 10 lavados de 5 minutos cada uno con TBST. Para detectar la actividad de HRP se utiliza el sustrato comercial Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific (Cat #: 32106) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los revelados se registraron con un equipo GBOX (Syngene) con un tiempo de exposición de 30 segundos.

5.4 Evaluación de las condiciones de almacenamiento

Las proteínas se almacenan en el buffer Tris-HCl 20 mM pH 8 con DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, Triton X-100 0,15 % y Glicerol 50 %. Las muestras son almacenadas a 4 °C, a diferencia de las que contienen Glicerol que se almacenan a -20 °C. Se evalúa la estabilidad a lo largo del tiempo por un periodo de un año tomando alícuotas de 100 µL. Las mismas son centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos. El precipitado se disuelve en 100 µL de Urea 8 M. El sobrenadante y el precipitado disuelto en Urea 8 M son analizados por SDS-PAGE, cargando en cada caso 20 µL.

5.5 Electroforesis bidimensional

La separación de las proteínas según el punto isoelectrico se realizó utilizando una tira *Immobiline Dry Strip* de 7cm con un gradiente de pH 4-7 (General Electric). Se mezclaron 145 µL de proteína en buffer de rehidratación con 1,25 µL de TCEP 0,5 M y 0,625 µL de anfolitos. Las condiciones de isoelectroenfoque utilizadas fueron: 12 horas de rehidratación a 20 °C, 300 V por 30 minutos, 500 V por 30 minutos seguidos de un gradiente de 1000 V por 1 hora hasta 8000 Vh. La tira de isoelectroenfoque fue utilizada para la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular en una SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 15 %.

5.6 Ensayo de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para la detección semicuantitativa de anticuerpos anti-Tpp en sueros humanos

Para realizar la detección semicuantitativa de anticuerpos anti-Tpp15, -Tpp17 y -Tpp47 en sueros humanos se utilizaron tres sueros seronegativos (denominados -2288, -2286 y -1964) y tres sueros seropositivos (denominados +32, +16 y +8). Se realizaron diluciones seriadas de cada suero y se evaluó su capacidad de detección de las proteínas recombinantes Tpp15, Tpp17 y Tpp47 producidas en este trabajo. El protocolo consistió en sensibilizar una placa de ELISA con 50 µL por pocillo de las soluciones de proteínas a una concentración de 1 µg/mL preparadas en buffer carbonato 0,1 M pH 9,6, incubando toda la noche a 4 °C. Luego de descartadas las soluciones, se bloquea la placa con 100 µL por pocillo de PBS 1X – Tween 20 1 % y se incuba una hora a 37 °C. Se lavan los pocillos tres veces con PBS 1X – Tween 20 0,05 %. Se preparan las diluciones de los sueros a evaluar en 1X – Tween 20 0,05 % y se

siembran por duplicado 50 μ L por pocillo, incubando una hora a 37 °C. Posteriormente, se realizan tres lavados con PBS 1X – Tween 20 0,05 %. Se agregan 50 μ L por pocillo de una dilución 1/50.000 de anticuerpo anti-humano IgG producido en cabra y conjugado a peroxidasa (Sigma) en PBS 1X – Tween 20 0,05 % y se incuba una hora por 37 °C. Luego de finalizada la incubación, se realizan tres lavados con PBS 1X – Tween 20 0,05 %. Se agregan 50 μ L por pocillo de sustrato TMB, se incuba 15 minutos a temperatura ambiente y se detiene la reacción con 25 μ L por pocillo de H₂SO₄ 2 N. El producto de la reacción es leído a 450 nm con filtro de 600 nm.

6. Resultados y Discusión

6.1. Tpp15

6.1.1 Clonado de la secuencia optimizada de Tpp15opt-6His en el vector de expresión pET22b(+)

La secuencia codificante de Tpp15 de *T. pallidum* fue sintetizada y clonada en el plásmido pUC57 por la compañía Genscript (Piscataway, NJ, USA). Resultados anteriores de nuestro laboratorio habían mostrado que la CDS nativa de Tpp15 se expresaba en muy bajos niveles en *E. coli*. Por tal razón, se solicitó la síntesis de una secuencia sinónima del gen de Tpp15, modificada mediante el algoritmo OptimumGene™ de dicha compañía, el cual aplica una serie de criterios que buscan adaptar la secuencia nucleotídica al organismo en el cual se va a expresar la proteína. Dicho algoritmo introduce de forma aleatoria el primer y segundo codón más utilizado de acuerdo a la utilización de codones del huésped a utilizar para la expresión de la proteína. A su vez, optimizan el contenido GC, eliminan elementos de acción en *cis*, sitios de corte de enzimas de restricción que puedan interferir con el posterior clonado en el plásmido de expresión y secuencias tipo Shine Delgarno internas que puedan estar presentes en la CDS. En el **Anexo A1.1**, se muestra una comparación de las secuencias nucleotídicas nativa de Tpp15 junto con la secuencia optimizada Tpp15opt.

En primera instancia, fue necesario transferir la secuencia Tpp15opt que estaba inserta en el plásmido pUC57, hacia el vector de expresión pET22b(+). El primer paso consistió en la amplificación tanto de pUC57-Tpp15opt-6His como del vector de destino. Se hizo una transformación de 100 μ L de células DH5 α quimiocompetentes con ambos plásmidos, y luego se procedió a la purificación de los mismos mediante minipreparación alcalina (**Figura 16**). Las masas moleculares esperadas corresponden a ~2.700 pb para pUC57-Tpp15opt-6His y 5.493 pb para pET22b(+).

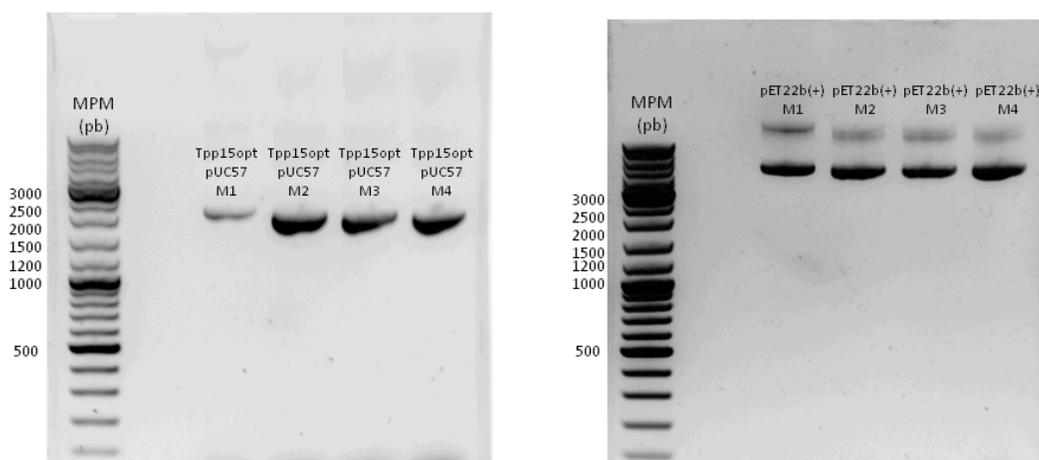


Figura 16. Análisis de los plásmidos pUC57-Tpp15opt-6His y pET22b(+) purificados mediante minipreparación alcalina. Electroforesis en gel de agarosa 1 %. En ambos casos, en cada carril se sembraron cantidades correspondientes a 180 ng de ADN (de acuerdo a los valores de A_{260}) por cuadruplicado (cada muestra denotada como M1 a M4). Marcador de peso molecular (MPM): GeneRuler DNA Ladder Mix (Cat #: SM0331), Thermo Scientific.

Se había previsto hacer el subclonado entre los sitios *NdeI* y *BamHI*, por lo cual los plásmidos fueron digeridos con estas enzimas de restricción. En ambos casos, se analizaron los patrones de digestión obtenidos a partir de la digestión de cada enzima por separado así como también de la doble digestión. En el caso del vector pUC57-Tpp15opt-6His, se espera obtener para *NdeI*, dos fragmentos (2.901 y 297 pb), con *BamHI*, un fragmento y para *NdeI* + *BamHI*, tres fragmentos (2.458, 443 y 297 pb), siendo el de 443 pb la secuencia de interés (**Figura 17**). Los tamaños esperados se deben a la presencia de dos sitios de corte de *NdeI* en pUC57-Tpp15opt-6His (posición 183, que es propia del plásmido pUC57, y posición 480 que fue incorporada por la secuencia que se sintetizó).

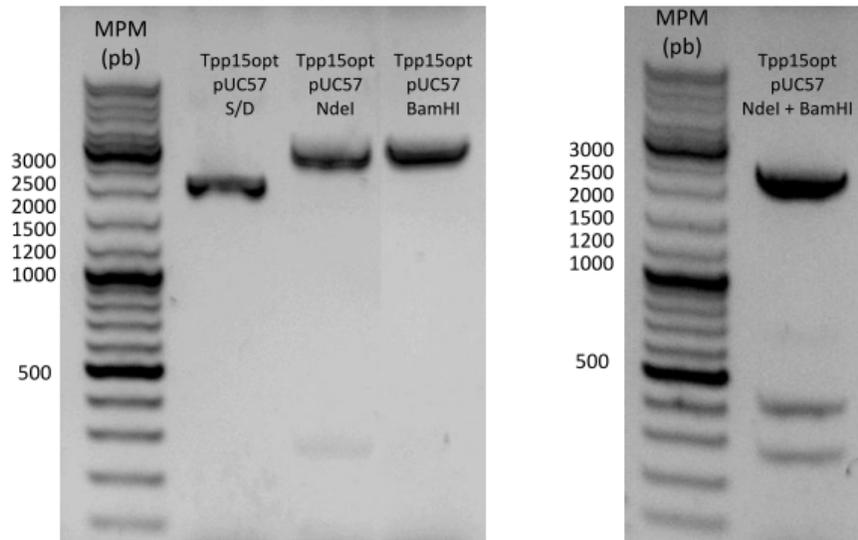
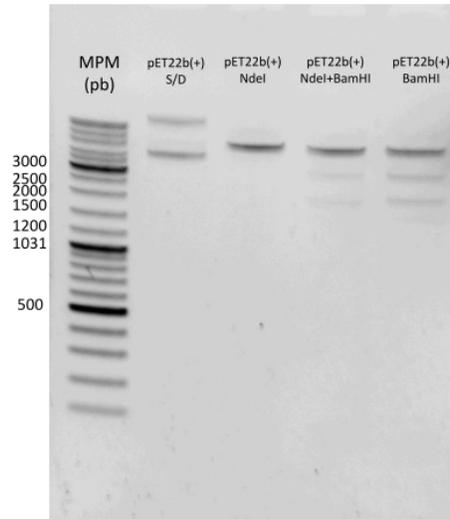


Figura 17: Análisis por electroforesis en gel de agarosa 1% de ADN del plásmido pUC57-Tpp15opt-6His. En el carril SD, ADN sin digerir. En los otros carriles, los productos de digestión con *NdeI*, *BamHI* y *NdeI* + *BamHI*. Marcador de peso molecular (MPM): GeneRuler DNA Ladder Mix (Cat #: SM0331), Thermo Fisher Scientific.

En el caso de la digestión de pET22b(+) con las distintas enzimas, se esperaría tener un solo fragmento en la digestión de *NdeI* y en la de *BamHI*, y en la digestión doble se esperaría tener un fragmento de 5.403 pb y 90 pb (**Figura 18**). (El de 90 pb corresponde a la región de policlonado, en tanto que el fragmento de 5.403 pb es el que se usará como vector para clonar la CDS de Tpp15opt.) Sin embargo, como puede observarse en la **Figura 18**, se obtuvieron tres fragmentos de ADN. Esto podría ser explicado por la actividad *Star* de *BamHI*. Según la intensidad de las bandas, se puede ver que la actividad *Star* no fue predominante, lo cual se evidencia por la baja intensidad relativa de las bandas suplementarias, y por lo tanto se pudo continuar trabajando con la banda de mayor peso molecular que corresponde al vector pET22b(+) linealizado mediante doble digestión *NdeI* + *BamHI*.

a)



b)

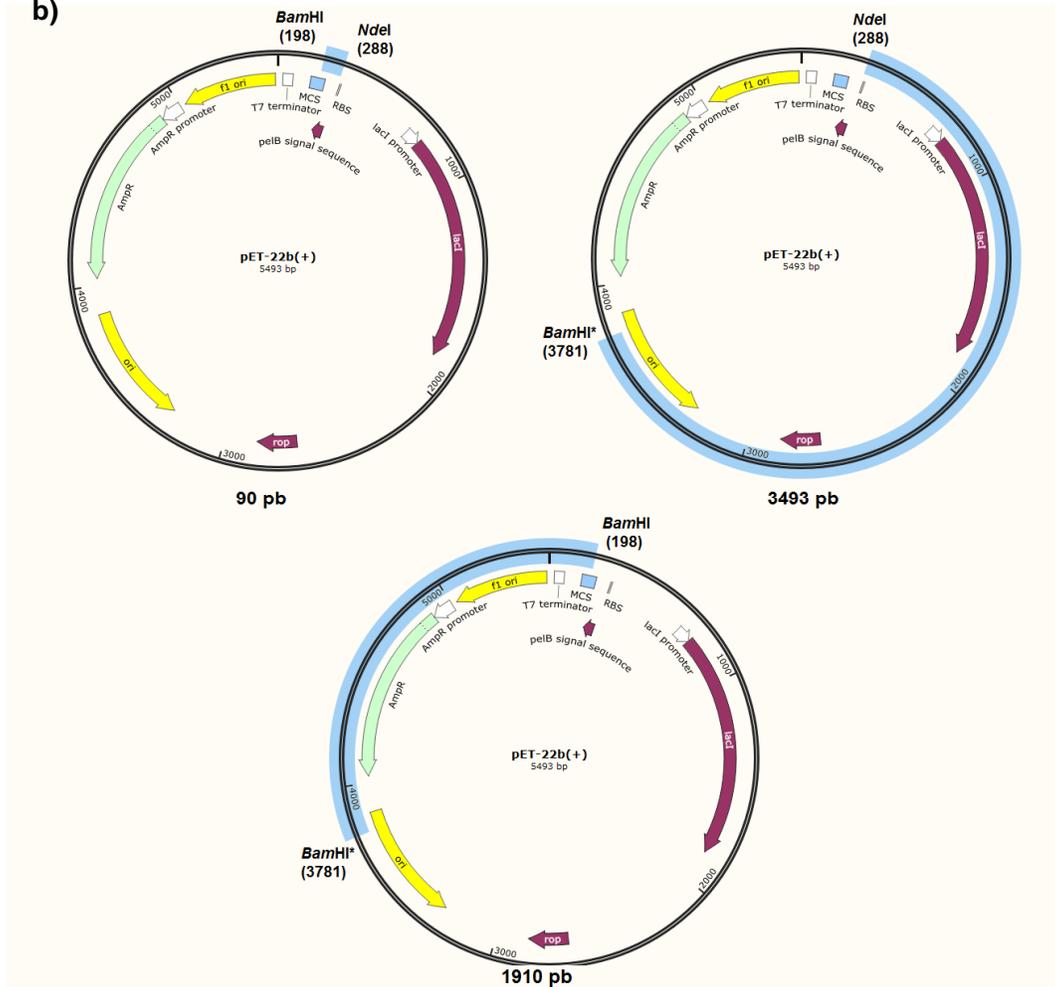


Figura 18: a) Preparación del vector de expresión pET22b(+). Análisis por electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de digestión de pET22b(+), así como también del plásmido sin digerir (S/D). Marcador de peso molecular (MPM): GeneRuler DNA Ladder Mix (Cat #: SM0331), Thermo Scientific. b) Representación de los sitios de corte de *NdeI*, *BamHI*, y los sitios *Star* de *BamHI* así como también el tamaño de los productos esperados en cada digestión.

Los productos de la doble digestión de pUC57-Tpp15opt-6His (443 pb) y pET22b(+) (5.403 pb) fueron purificados a partir del gel de agarosa de 1 %. Los productos obtenidos fueron ligados utilizando la enzima T4 DNA Ligasa (Biolabs), esperando lograr de esta forma la inserción del fragmento codificante para Tpp15opt-6His en el vector de expresión pET22b(+) tal cual se muestra en el **Anexo A2.1**. El producto de ligación fue transformado en células quimiocompetentes DH5 α y el plásmido fue purificado mediante minipreparación alcalina (**Figura 19**). En 9 de las 10 colonias analizadas se obtuvieron bandas que podrían ser del peso molecular esperado (5.846 pb). Sin embargo, tanto la resolución de esta electroforesis como el hecho de que se trata de plásmidos superenrollados, no permiten determinar con certeza si contienen el inserto deseado. Por tal razón, para poder demostrar la presencia de inserto, se procedió a un análisis por PCR, con cebadores que se encuentran a uno y otro lado del sitio de policlonado de pET22b(+).

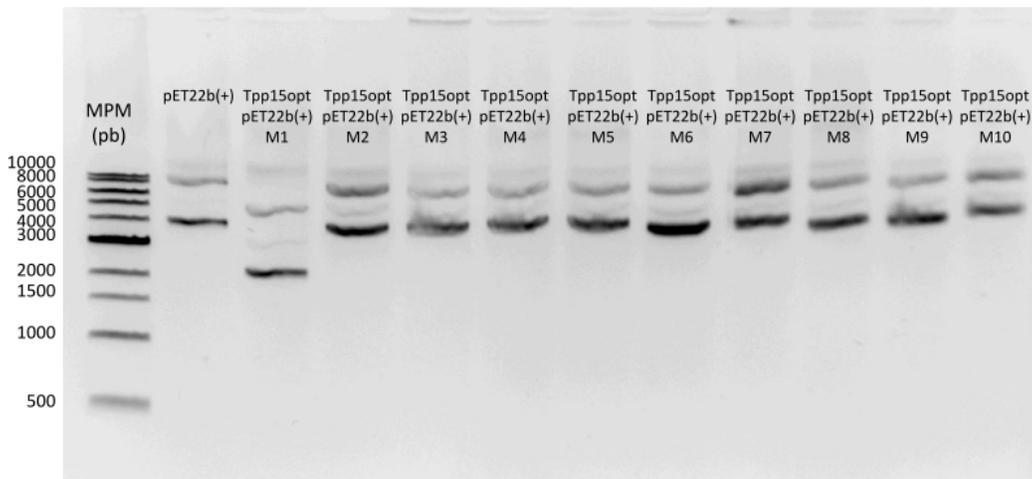


Figura 19: Análisis del clonado de la CDS Tpp15opt-6His en pET22b(+). Electroforesis en gel de agarosa 1 % de minipreparaciones alcalinas de ADN de plásmidos de diferentes clones independientes. Marcador de peso molecular (MPM): 1kb DNA Ladder (Cat #: N3232L), New England Biolabs.

Para confirmar la presencia del inserto en los plásmidos obtenidos se realizó una PCR utilizando las muestras: M4, M8 y M10 (ver **Figura 19**) utilizando al plásmido pUC57-Tpp15-6His como control de la presencia de inserto, y como control negativo, el plásmido pET22b(+) (**Figura 20**). De las tres muestras analizadas, M10 presenta una banda de peso molecular correspondiente al inserto de Tpp15opt-6His. Para confirmarlo, se mandó a secuenciar este plásmido al servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo (IPMONT), confirmando la secuencia correcta del inserto (**Anexo A2.2**). De esta forma, se logró construir el plásmido de expresión (pET22b(+)) conteniendo la secuencia de Tpp15-6His optimizada lista para utilizarla en la transformación de la cepa de *E. coli* de expresión (BL21(DE3)Star).

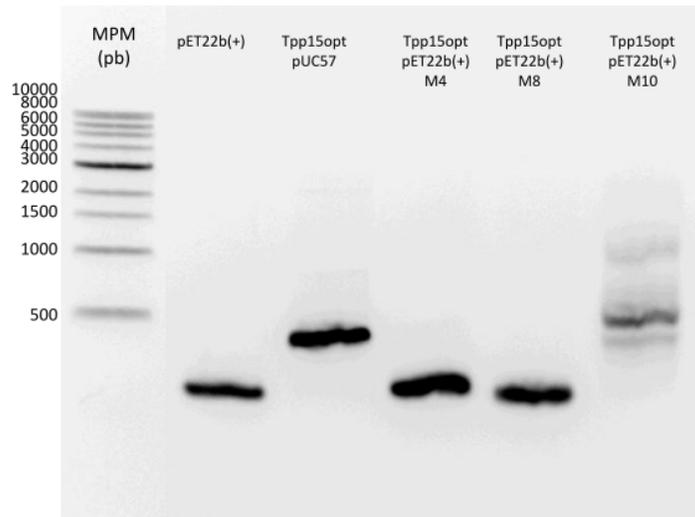


Figura 20: Análisis por PCR de clones obtenidos por ligación con T4 DNA ligasa de la CDS Tpp15opt-6His y pET22b(+). Electroforesis en gel de agarosa 1 % de los productos obtenidos a partir de la amplificación por PCR con los primers mencionados en el punto 1.2 de Métodos. Marcador de peso molecular (MPM): 1kb DNA Ladder (Cat #: N3232L), New England Biolabs .

6.1.2 Expresión de Tpp15

El primer paso en la expresión de una proteína recombinante, consiste en evaluar distintas condiciones y el éxito de cada condición ensayada a través de la medida del nivel de expresión de proteína expresada. En el caso de Tpp15, se evaluaron dos condiciones de expresión, las cuales se detallan a continuación.

El plásmido pET-Tpp15opt-M10, fue utilizado para la transformación de células *E. coli* BL21(DE3)Star quimiocompentes. Este mismo procedimiento a su vez, fue realizado utilizando el plásmido pET-Tpp15wt-6His, el cual contiene la CDS salvaje de Tpp15 fusionada a un tag de 6 histidinas, con el fin de comparar los niveles de expresión de proteína. Posteriormente, se procedió a la expresión de Tpp15 a partir de la secuencia codificante optimizada y salvaje. Para ello, en ambos casos, se realizó la expresión en 200 mL de medio autoinductor ZYM5052 utilizando dos condiciones: agitación a 200 rpm a 37 °C por 16 horas y a 20 °C por 20 horas (partiendo de un cultivo con una $DO_{600nm} = 1$). El buffer de lisis utilizado en los fraccionamientos de los cultivos realizados a 37°C fue Tris-HCl 20 mM pH 8, mientras que para los cultivos realizados a 20 °C fue Tris-HCl 20 mM pH 8 + NaCl 0,1 M. En ambos casos se utilizó urea 4 M en Tris-HCl 20 mM pH 8 para la solubilización del precipitado correspondiente a la fracción insoluble. Luego del fraccionamiento, se analizó la expresión de Tpp15 mediante electroforesis denaturalizante en gel de poliacrilamida al 15 % (**Figura 21**).

Como se puede observar, en ninguna de las dos condiciones de expresión utilizadas se logra detectar la expresión de Tpp15 a partir de la secuencia salvaje, siendo

indetectable tanto en la fracción soluble como en la insoluble. Contrariamente, a partir del plásmido de expresión que contiene la secuencia optimizada de Tpp15 se obtiene una banda de intensidad significativa cercana a los 15 kDa. La misma es expresada en forma soluble a 20 °C, mientras que a 37 °C se encuentra en la fracción insoluble formando parte de los cuerpos de inclusión.

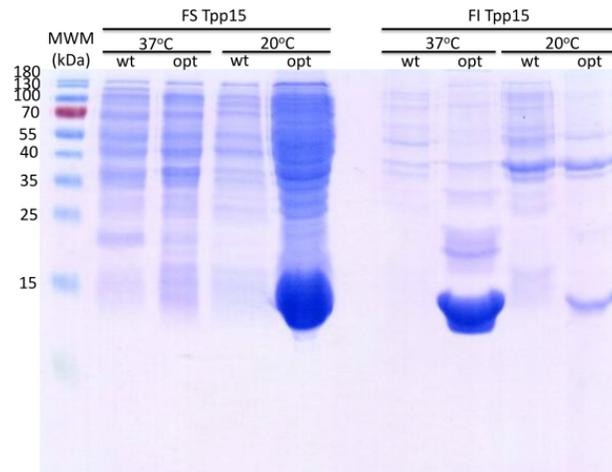
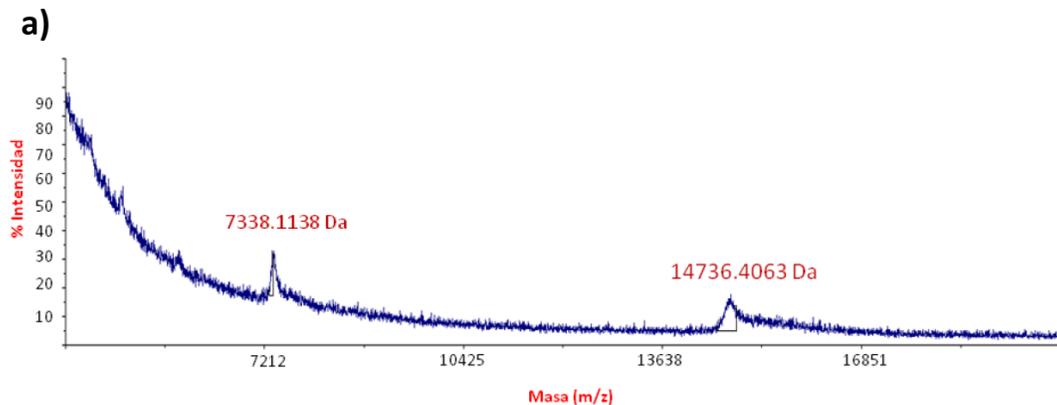


Figura 21: Análisis de la expresión de Tpp15. Los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 15 %, 1 mm. Fracciones solubles (FS) e insolubles (FI) obtenidas a partir de los cultivos realizados a 37 °C y 20 °C utilizando la secuencia optimizada (opt) y salvaje (wt) de Tpp15. Marcador de peso molecular (MPM): PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616), Thermo Fisher Scientific.

Si bien en la expresión de Tpp15opt-6His a 20°C y 37°C se observa una banda clara que ronda los 15 kDa, la identidad de la misma debe ser confirmada utilizando metodologías que permitan elucidar su secuencia aminoacídica. Es por ello, que la identidad de la proteína fue determinada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en la UByPA del IPMONT (**Figura 22**). Como primera aproximación, se analizó la proteína íntegra. El espectro se obtuvo en un equipo 4800 MALDI TOF/TOF (Abi Sciex) en el modo de adquisición lineal. Se observa la señal correspondiente a Tpp15 de 14.736,4063 Da, mientras que la señal de 7.338,1138 Da correspondería al ion dicargado. Seguidamente, se analizaron los péptidos que fueron obtenidos mediante digestión con Tripsina de dicha muestra. Los pesos moleculares de los péptidos obtenidos corresponden a la proteína Tpp15-6His, con una cobertura de secuencia del 73 %.



b)

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Sequence	
2 - 12	1229.5869	1228.5796	1228.5724	0.0072	M. SFSSIPNGTYR. A	(Ions score 55) Deamidated (NO)
13 - 24	1473.6307	1472.6234	1472.6208	0.0026	R. ATYQDFDENGWK. D	(Ions score 56)
25 - 35	1227.5861	1226.5788	1226.5819	-0.0031	K. DFLEVTFDGGK. M	(Ions score 56)
36 - 46	1409.6995	1408.6922	1408.6809	0.0113	K. MVQVVYDYQHK. E	(Ions score 24)
36 - 46	1425.6844	1424.6771	1424.6758	0.0013	K. MVQVVYDYQHK. E	(Ions score 53) Oxidation (M)
84 - 103	2096.9980	2095.9907	2095.9845	0.0063	K. GNPPEMVDVVTGATVSSQSF. R	(Ions score 91) Oxidation (M)
105 - 114	999.5904	998.5831	998.5873	-0.0041	R. LGAALLQSAR. R	(Ions score 44)

c)

1 MSFSSIPNGT YRATYQDFDE NGWKDFLEVT FDGGKMQVV YDYQHKEGRF
51 KSQDADYHRV MYASSGIGPE KAFRELADAL LEKGNPEMVD VVTGATVSSQ
101 SFRRLLGRALL QSARRGEKEA IISRRHHHHH

Figura 22: Análisis del producto de expresión de la proteína Tpp15 recombinante. **a)** Espectro de masas obtenido por MALDI TOF de la banda cercana a los 15 kDa obtenida a partir de la expresión de Tpp15-6His. **b)** Secuencias de los péptidos obtenidos a partir de la digestión con tripsina de Tpp15-6His. **c)** Cobertura de la secuencia de Tpp15-6His (en rojo) identificada por MALDI-TOF-TOF, correspondiente al

A partir de los resultados obtenidos, pudimos confirmar que la utilización de la secuencia optimizada de Tpp15-6His resultó ser crucial para la expresión de la misma en ambas condiciones ensayadas ya que la expresión de Tpp15-6His a partir de la CDS salvaje no llegó a alcanzar niveles de expresión detectables por SDS-PAGE bajo estas mismas condiciones. Estos resultados concuerdan con muchos estudios que se han realizado utilizando la secuencia optimizada de la proteína para lograr un mayor nivel de expresión, siendo aplicada a una gran variedad de proteínas expresadas en *E. coli*, desde PDI (Proteína isomerasa de disulfuro) (Niemitalo et al., 2005), carboxylesterasa hidrolizante de poli-etilen tereftalato (Oeser et al., 2010), oxidasa de sarcosina (Tong et al., 2016) hasta partículas de origen viral (Wu, Chen, Chi, Chien, & Huang, 2016). De esta forma, se remarca la importancia de adecuar la utilización de codones al sistema de expresión seleccionado. A su vez, el cambio en la temperatura de expresión de Tpp15opt-6His resultó ser decisivo en cuanto a la forma (soluble ó insoluble) en la cual se expresa la proteína. Estos resultados eran de esperar, ya que una de las estrategias usualmente utilizadas para lograr la expresión de una proteína en su forma soluble es a través de la expresión a temperaturas menores a los 37 °C (Jana & Deb, 2005).

El siguiente paso consistió en optimizar las condiciones de purificación de Tpp15-6His a partir de las fracciones soluble e insoluble obtenidas a partir de los cultivos realizados a 20 °C y 37 °C, respectivamente.

6.1.3 Purificación de Tpp15 a partir de la fracción insoluble (FI): Tratamiento FI cultivo 37 °C

Cuando una proteína recombinante se expresa formando cuerpos de inclusión, se deben determinar las condiciones de solubilización adecuadas utilizando comúnmente agentes caotrópicos como Urea y Cloruro de Guanidinio. En muchas ocasiones, son suficientes bajas concentraciones del agente caotrópico debido a la naturaleza de los cuerpos de inclusión formados (Vallejo & Rinas, 2004), que pueden estar constituidos por la proteína de interés cuya estructura secundaria puede llegar a estar poco alterada. Contrariamente, la existencia de cuerpos de inclusión que alberguen a la proteína de interés en su forma casi completamente desplegada, hacen que sean necesario utilizar condiciones de solubilización más fuertes (ej. agente caotrópico como Cloruro de Guanidinio o altas concentraciones de Urea, complementación con detergentes, etc). Teniendo en cuenta las características únicas en las cuales se puede encontrar la proteína de interés en los cuerpos de inclusión es que comenzamos evaluando la capacidad solubilizadora del agente caotrópico Urea en el caso de Tpp15.

Para evaluar la mínima concentración de urea necesaria para solubilizar los cuerpos de inclusión, la fracción insoluble fue resuspendida en urea 4 M y 2 M. Se dejó transcurrir la solubilización de los cuerpos de inclusión con agitación toda la noche. Se tomaron alícuotas de 200 µL, que se centrifugaron a 20.400 x g por 15 minutos. El sobrenadante obtenido en ambos casos corresponde a las proteínas de los cuerpos de inclusión que lograron ser solubilizados. Los sedimentos, correspondientes a las proteínas de los cuerpos de inclusión que no lograron ser solubilizados, fueron resuspendidos en 200 µL de urea 8 M. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 15 %. Como se puede observar en el gel de la **Figura 23**, tanto las concentraciones de urea 2 M como 4 M son suficientes para lograr la solubilización casi completa de Tpp15.

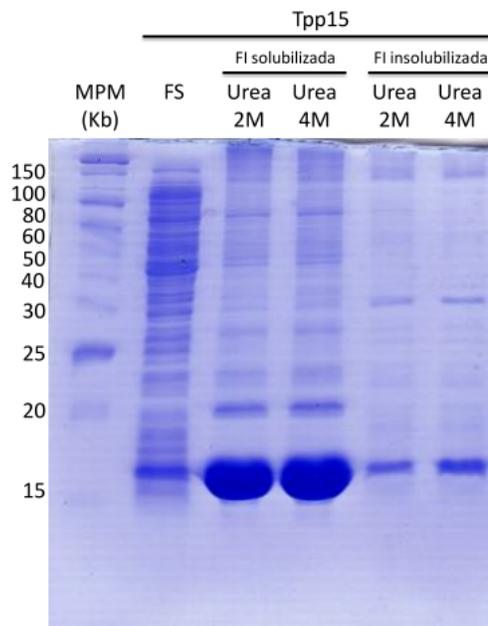


Figura 23: Análisis de la solubilización en urea de la fracción insoluble de Tpp15-6His. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15 %, 1 mm. MPM: marcador de peso molecular; FS: fracción soluble Proteínas de los cuerpos de inclusión solubilizadas con urea 2 M y 4 M (FI solubilizada, 5 μ L) y que no lograron ser solubilizadas con estos mismos buffers (FI insolubilizada, 5 μ L). Fracción soluble obtenida luego del fraccionamiento del cultivo realizado a 37°C (FS). Marcador de peso molecular: Unstained Protein Ladder (Cat #: P7703S), New England Biolabs.

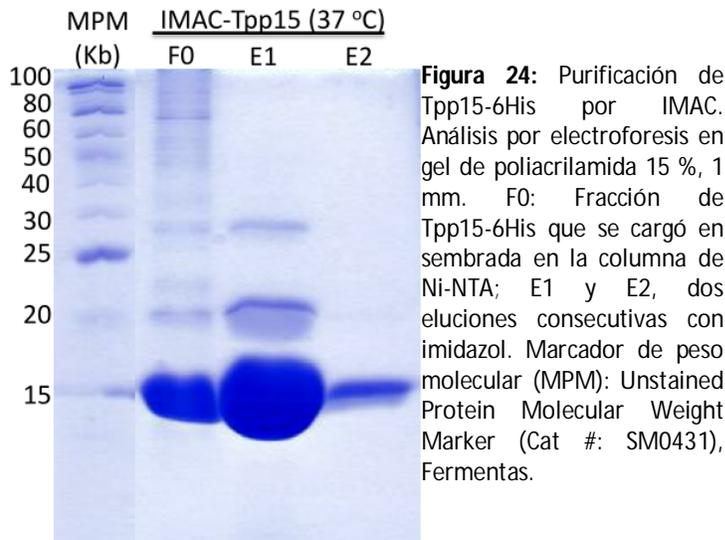
Posteriormente, se realizó la cuantificación de proteínas utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) de los 6 mL de la fracción insoluble resuspendida en urea 2M, con el fin de obtener una aproximación de la concentración de Tpp15. La misma resultó ser de 2,1 mg/mL (**Anexo A3.1**). A partir de estos resultados, con el fin de incrementar la cantidad de Tpp15 solubilizada a partir de los cuerpos de inclusión, se procedió a la resuspensión de los mismos con un mayor volumen de urea que el utilizado en el ensayo anterior, con el propósito de lograr una concentración de proteína cercana a 1 mg/mL, la cual es recomendada para la solubilización de cuerpos de inclusión (Yamaguchi & Miyazaki, 2014). Esto se debe al hecho de que, a concentraciones más altas de proteína se favorece la formación de agregados. De esta forma, el trabajar a concentraciones cercanas a 1 mg/mL se intenta disminuir la probabilidad de formación de agregados proteicos durante el proceso de renaturalización.

6.1.4 Purificación de Tpp15 por IMAC en columna de Ni-NTA

Luego de haber establecido las condiciones óptimas de solubilización de Tpp15 a partir de los cuerpos de inclusión, procedimos a la purificación de la misma por IMAC, dado que la Tpp15 fue diseñada para que contenga una cola de 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal. En este paso de purificación, tuvimos en cuenta el hecho de que Tpp15 estaba presente en un buffer con urea 2M y es por ello que a la hora de diseñar el protocolo de purificación por IMAC, evaluamos la disminución gradual de esa concentración de urea con el fin de lograr la renaturalización total de la proteína en la columna Ni-NTA. En este caso, se partió de un cultivo de 200 mL en medio ZYM5052 de Tpp15 a 37 °C por 16 horas y a 20 °C por 20 horas (partiendo de un cultivo con una $DO_{600nm}=1$). La masa celular obtenida fue de 2,02 g y 5,41 g de peso húmedo, respectivamente.

El sedimento correspondiente a los cuerpos de inclusión obtenidos del cultivo a 37 °C, fue resuspendido en 20 mL de urea 2 M y se dejó transcurrir la solubilización durante toda la noche con agitación. Luego de la centrifugación a 20.400 x g por 15 minutos, el sobrenadante fue filtrado con filtro de 0,45 μ m y se realizó renaturalización de Tpp15 de acuerdo al Método A descrito en la sección Métodos. Específicamente, la adsorción de Tpp15 a la resina de Ni-NTA se realizó en 30 minutos con agitación. Luego de recoger el percolado, se realizaron lavados de 10 mL cada uno con soluciones de urea de concentraciones decrecientes, y se realizó la elución en Tris-HCl 20 mM pH 8 + imidazol 500 mM (**Figura 24**). En el gel de poliacrilamida, se observa que en las eluciones se obtiene Tpp15 con un alto grado de pureza con este único paso de purificación, observándose en menor concentración una banda correspondiente a los 20 kDa y otra a los 30 kDa, pudiendo corresponder esta última a dímeros de Tpp15 (lo cual pudimos confirmar posteriormente por espectrometría de masas (datos no mostrados)).

De acuerdo a los datos obtenidos de la renaturalización de Tpp15, la estrategia de renaturalización en columna resultó exitosa. Al igual que en muchos resultados encontrados en la literatura (Jiang et al., 2013; H. Kim, Lee, Park, & Jeon, 2015; Odunuga, Adekoya, & Sylte, 2015; Promnares, Junkree, Day, & Imwong, 2015; Xi et al., 2016; Yuan, Zhou, Yang, Li, & Wan, 2014; Zhai et al., 2016) que utilizaron esta misma estrategia para purificar proteínas a partir de los cuerpos de inclusión, en este caso se logró solubilizar a Tpp15 y que la misma permaneciera estable a lo largo del tiempo (ver Almacenamiento de Tpp15 más adelante).



En el caso del cultivo a 20 °C, donde se había observado que la Tpp15 se obtenía en forma soluble, la fracción soluble en Tris-HCl 20 mM pH 8 + NaCl 0,1 M de las células lisadas, fue filtrada con filtro de 0,45 μ m antes de cargarla en la columna de Ni-NTA. Luego de la adsorción de la proteína a la resina por 30 minutos, se recogió el percolado y se realizaron dos lavados: uno con 10 mL de Tris-HCl 20 mM pH 8 + NaCl 0,1 M y el otro con 50 mL de Tris-HCl 20 mM pH 8 + imidazol 10 mM. Posteriormente, se realizó la elución de Tpp15 con Tris-HCl 20 mM pH 8 + imidazol 500 mM (**Figura 25**). De forma análoga a la purificación de Tpp15 a partir de los cuerpos de inclusión, en estas eluciones también se obtiene Tpp15opt con un alto grado de pureza, estando presente también en este caso la banda de menor intensidad de peso molecular cercano a 20 kDa.

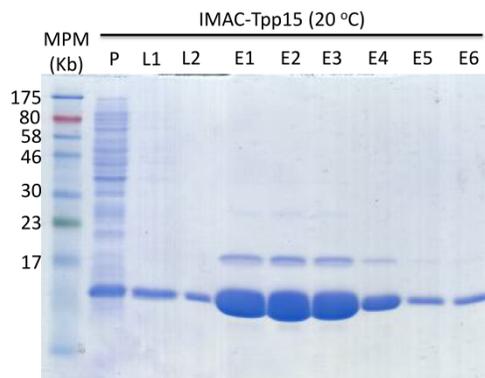


Figura 25: Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida 15 %, 1 mm. Perfil de elución obtenido a partir de la purificación de Tpp15-6His por IMAC. Percolado (P), Lavado 1 y 2 (L1 y L2), Eluciones 1 a 6 (E1 a E6). Marcador de peso molecular: Unstained Protein Ladder (Cat #: P7703S), New England Biolabs.

Las eluciones fueron posteriormente desaladas en Tris-HCl 20 mM pH 8 y la concentración de Tpp15 fue medida utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) (**Anexo A3.2 y 3.3**). A partir de estos resultados se calculó un rendimiento de Tpp15 de **437 mg/L** para la que fue purificada a partir de los cuerpos de inclusión solubilizados en urea (cultivo a 37 °C), y de **600 mg/L** para la proteína purificada a partir del extracto celular soluble (cultivo a 20 °C).

En vistas de estos resultados, vemos que en la expresión a 20 °C obtenemos un mayor rendimiento que a 37 °C. A esto hay que sumarle el hecho de que no necesitamos renaturalizar a la proteína y por lo tanto disminuimos el número de pasos de purificación, lo cual representa una ventaja importante a la hora de producir la proteína a nivel industrial. A su vez, los trabajos que reportan la purificación de Tpp15 se realizaron a partir de lisados de *Treponema pallidum* (Purcell, Swancutt, & Radolf, 1990) ó a partir del clonado y expresión de la secuencia de Tpp15 incluyendo el péptido señal (Purcell et al., 1989), logrando la expresión de la misma en la membrana citoplasmática de *E. coli*. En ambos casos, las cantidades obtenidas son significativamente inferiores teniendo en cuenta la limitante que representa depender de la purificación a partir de la propia espiroqueta, así como también la complejidad a la hora de obtener cantidades suficientes de la misma, la cual al no poder ser cultivada in vitro debe ser purificada de testículos de conejo infectados. A su vez, la expresión de la proteína a nivel de la membrana citoplasmática representa una limitante en cuanto a la cantidad de proteína que puede ser expresada como consecuencia de la superficie disponible de la membrana citoplasmática de *E. coli*.

El hecho de haber visto en ambas purificaciones por IMAC Ni-NTA una banda cercana a los 20 kDa, nos plantea la pregunta de si esa banda puede llegar a ser productos de unión inespecífica a la columna que requieren de condiciones de lavado más fuertes para ser eliminadas. Es por ello, que el siguiente paso consistió en identificar esa banda, como se muestra a continuación.

6.1.5 Análisis de los productos que co-purifican con Tpp15 en la IMAC mediante *western blot* y espectrometría de masa

Si bien los datos de espectrometría de masa referidos anteriormente confirman que la proteína mayoritaria que se detecta en SDS-PAGE a la altura de 15 kDa es efectivamente Tpp15, no se había podido definir la identidad de los productos que co-purifican en la IMAC (bandas de 20 kDa). Como primera aproximación, se realizó un análisis por *western blot* de acuerdo al protocolo descrito en Métodos a partir de un gel de poliacrilamida al 15 %. Se utilizó un anticuerpo dirigido contra el tag de histidinas. Se sembraron 2,3 µg de la muestra obtenida en la purificación por IMAC, y como control negativo se sembró la misma cantidad de BSA. En la **Figura 26** se

presenta el gel de poliacrilamida al 15 % con las muestras analizadas, así como también la membrana de nitrocelulosa luego del revelado. En el *western blot* se observa una banda del tamaño correspondiente a Tpp15 y una banda más tenue correspondiente a un peso molecular aparente que ronda los 20 kDa que correspondería a la banda observada en las purificaciones por Ni-NTA. Esto indicaría la presencia de una proteína de mayor tamaño molecular que la Tpp15, que contendría un tag de histidinas o que sería intrínsecamente rica en histidinas.

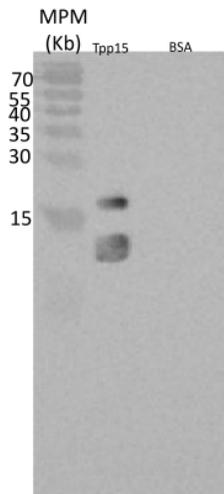
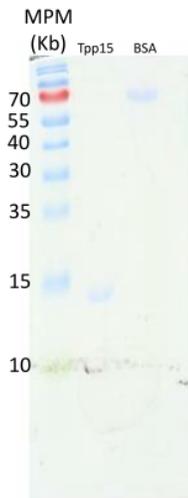


Figura 26: Análisis por *western blot* de las especies que co-purifican con Tpp15-His en la IMAC. A la izquierda, imagen del gel de electroforesis teñido con azul de Coomassie. A la derecha, membrana de nitrocelulosa a la que se transfirió un gel corrido en paralelo, incubada con anticuerpo anti tag de histidinas y revelado con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. Marcador de peso molecular (MPM): PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616), Thermo Scientific.

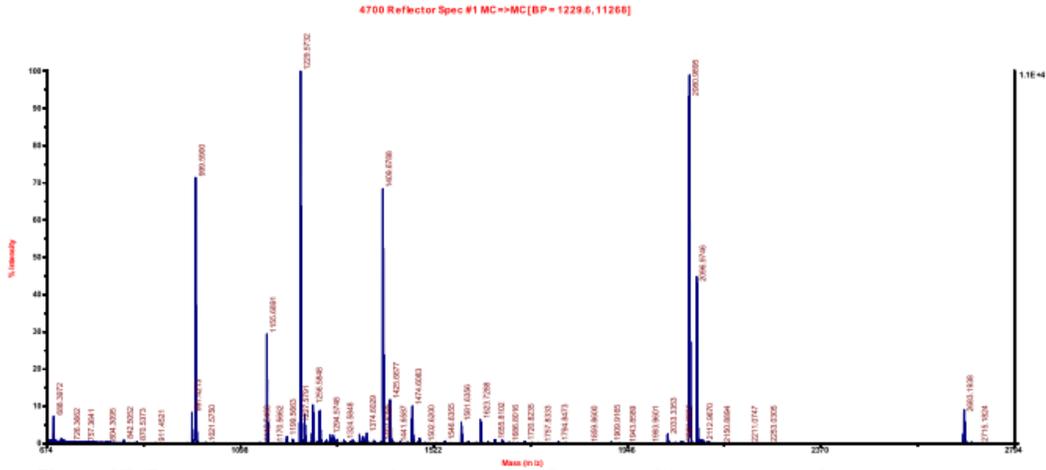
Con el fin de identificar la banda de tamaño molecular cercano a los 20 kDa, se analizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF la banda correspondiente a este tamaño (**Figura 25**). Los resultados reportaron que se trata de una proteína de 18.870 Da. Lo que resultó llamativo es que casi todos los péptidos generados por tripsina a partir de esta proteína coinciden con los esperados para Tpp15, excepto uno de ellos, cuyo peso molecular es 4.151,4 Da. La fragmentación en el espectrómetro de este péptido mostró que podía corresponder a la secuencia WDPAANKARKEAEIGSSDPNSSVDKLAALAEHHHHH. Un análisis de la secuencia nucleotídica del plásmido pET22-Tpp15opt-6His permitió deducir que un péptido con esas características puede ser generado durante la traducción si el codón STOP UGA es leído como un codón Trp, de manera tal que la síntesis continuaría hasta el siguiente codón STOP en esa fase de lectura. (**Figura 27**). Este fenómeno ha sido reportado por *MacBeath & Kast* (MacBeath & Kast, 1998), en el cual encontraron una alta influencia de la presencia de la purina G en sentido 3' al codón STOP UGA con la incorporación de un residuo de W en lugar del codón STOP, lo cual corresponde a lo observado en pET22-Tpp15opt-6His (**Figura 28**). De hecho, se ha establecido que el tRNA^{Trp} tiene la capacidad de codificar el codón STOP UGA con una eficiencia del 3 % (Eggertsson & Soll, 1988), lo cual se vuelve significativo en los casos en los cuales se logran altos

niveles de expresión de proteínas heterólogas. En base a estos resultados, es común la elección de un codón STOP diferente a UGA, así como también la inclusión de más de un codón STOP con el fin de reducir estos efectos.

Cpp15-6His-38aa

```

1 MSFSSIPNGT YRATYQDFDE NGKNDLEVT FDGGRNQVV YDYQHBGRF
51 KSQDRDYHRV MYASSGIGPE KAFPELADAL LERGRPERVD VVTGATVSSQ
101 SPRLGLRALL QSARRGERER IISRHHHHHH MDPAARRKFK EREIGSSDFH
151 SSSVRLARRA LERHHHHHH
  
```



6.1.6 Almacenamiento de Tpp15

Se evaluó la estabilidad de Tpp15 a lo largo del tiempo bajo distintas condiciones de almacenamiento. Los buffers utilizados fueron Tris-HCl 20 mM pH 8 + DTT 1 mM + EDTA 0,1 mM y este mismo buffer con la adición de Triton X-100 0,15 % y de Glicerol 50 %. Estos aditivos son comúnmente utilizados en el almacenamiento de las proteínas (Franks, 1993; Simpson, 2015). La adición del agente reductor DTT en concentraciones de 1-5 mM previene la oxidación de los residuos de Cisteína, Metionina y Triptofano. Al igual que el agente reductor, la adición del agente quelante también colabora con la preservación de la proteína en su estado reducido previniendo la oxidación mediada por metales. La adición de un detergente no iónico como Triton X-100 se vuelve esencial en los casos en los que la concentración de proteína es inferior a los 50 µg/mL, ya que previene las pérdidas de proteínas debido a la adsorción de éstas a las paredes del recipiente de almacenamiento. Finalmente, la adición de Glicerol como crioprotector resulta de gran importancia cuando el almacenamiento se hace a temperaturas inferiores a 0 °C ya que evita la congelación de la solución, lo cual suele tener efectos adversos en la estructura de las proteínas.

La concentración de Tpp15 almacenada en cada caso fue de 9 mg/mL. Se tomaron alícuotas a los 2, 3, 5 y 12 meses de almacenamiento. Luego de ese tiempo, se centrifugaron las muestras para separar la fracción que pudiera haberse insolubilizado durante ese lapso. Como se observa en la **Figura 29**, desde el punto de vista de la integridad de la cadena peptídica, en la fracción que se mantuvo soluble no se aprecian cambios sustanciales (no se detectan productos de degradación), excepto en las muestras que no contienen glicerol. En las muestras almacenadas sin glicerol se puede notar la aparición (solo al término de 12 meses) de una banda muy tenue, de menor peso molecular que Tpp15opt, que podría corresponder a un producto de degradación. En cuanto a la formación de agregados, en todos los casos se detecta una pequeña cantidad de proteína en la fracción insoluble luego de 12 meses de almacenamiento. Siendo comparativamente tan pequeñas esas cantidades, no se puede descartar que en las condiciones experimentales que se utilizaron, éstas se expliquen por una contaminación entre los carriles de la electroforesis.

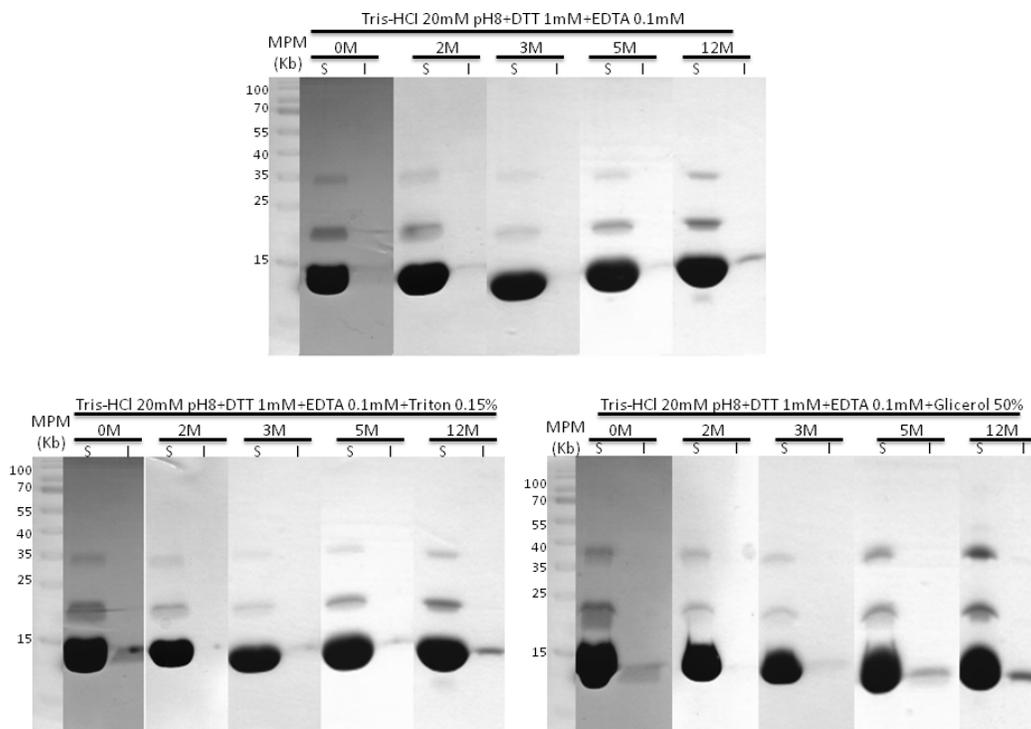


Figura 29: Análisis de la estabilidad durante el almacenamiento de Tpp15. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15 % de muestras almacenadas durante hasta 12 meses en diferentes buffers. En cada caso se detalla el buffer de almacenamiento utilizado, los meses en los cuales se tomaron las alícuotas (0 M, 2 M, 3 M, 5 M y 12 M), así como también las fracciones solubilizadas (S) e insolubilizadas (I). Marcador de peso molecular (MPM): PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616), Thermo Scientific.

Si bien luego del período de 12 meses de almacenamiento no se detectó degradación de Tpp15, también es cierto que los efectos del almacenamiento sobre las proteínas no solo consisten en la degradación de las mismas. El estudio de los efectos del almacenamiento sobre las proteínas no solo consiste en el análisis de la degradación o precipitación, sino también en modificaciones químicas espontáneas que pueden afectar la funcionalidad de la proteína (Gang Xing, Junmei Zhang, Yue Chen, 2010). Dentro de este tipo de modificaciones se encuentran la esterificación y etilación de aspartato y glutamato; metilación, acetilación, biotilación, ubiquitinación y sumoilación de residuos de lisina; adición de moléculas de iodoacetamida, DTT y β -mercaptoetanol a residuo de cisteína, entre otras. Todas estas modificaciones pueden visualizarse mediante espectrometría de masas a través del cambio en la masa molecular. Otra modificación incluye la desaminación de residuos de asparaginas, la cual se traduce en un cambio en la masa molecular de 1 Da y en modificaciones del punto isoeléctrico de la proteína (Sarioglu, Lottspeich, Walk, & Eckerskorn, 2000).

Es por ello que con la finalidad de observar la existencia de modificaciones químicas espontáneas como consecuencia del almacenamiento de Tpp15, se realizó una electroforesis bidimensional (**Figura 30**). Se analizaron muestras de Tpp15 almacenada

en Glicerol 50 % comparando los perfiles obtenidos luego de 18 meses de almacenamiento. En la electroforesis bidimensional correspondiente a la muestra previa al almacenamiento, se puede observar un punto mayoritario correspondiente a Tpp15 cuyo pI es cercano a 6,3, el cual resulta ser cercano al pI calculado de Tpp15 de 6.4 (<http://web.expasy.org/protparam/>). A su vez, se puede observar una señal correspondiente al producto obtenido de 18,8 kDa identificado por espectrometría de masas que se obtiene como consecuencia del salto del codón STOP de Tpp15. De esta forma, podemos corroborar el alto grado de pureza de Tpp15 estando presente en una única forma mayoritaria. Por otro lado, en la electroforesis bidimensional de la muestra de Tpp15 almacenada por un período de 18 meses, vemos que no aparecen señales correspondientes a otras masas moleculares, lo cual está en concordancia con los resultados de los geles unidimensionales en los cuales se analizó la estabilidad de Tpp15 (ver **Figura 29**). Sin embargo, sí se observa la presencia de señales de igual masa molecular que Tpp15 pero con distinto punto isoeléctrico, presentando un patrón de "train spots". Este fenómeno, previamente estudiado por *Sarioglu et al 2010*, podría corresponder a la desaminación de asparaginas como consecuencia del almacenamiento. De esta manera, se habrían formado distintas poblaciones de Tpp15 que se diferencian en el número y en la disposición de asparaginas desaminadas, que al transformarse en aspartatos, tiene como consecuencia una disminución de los puntos isoeléctricos.

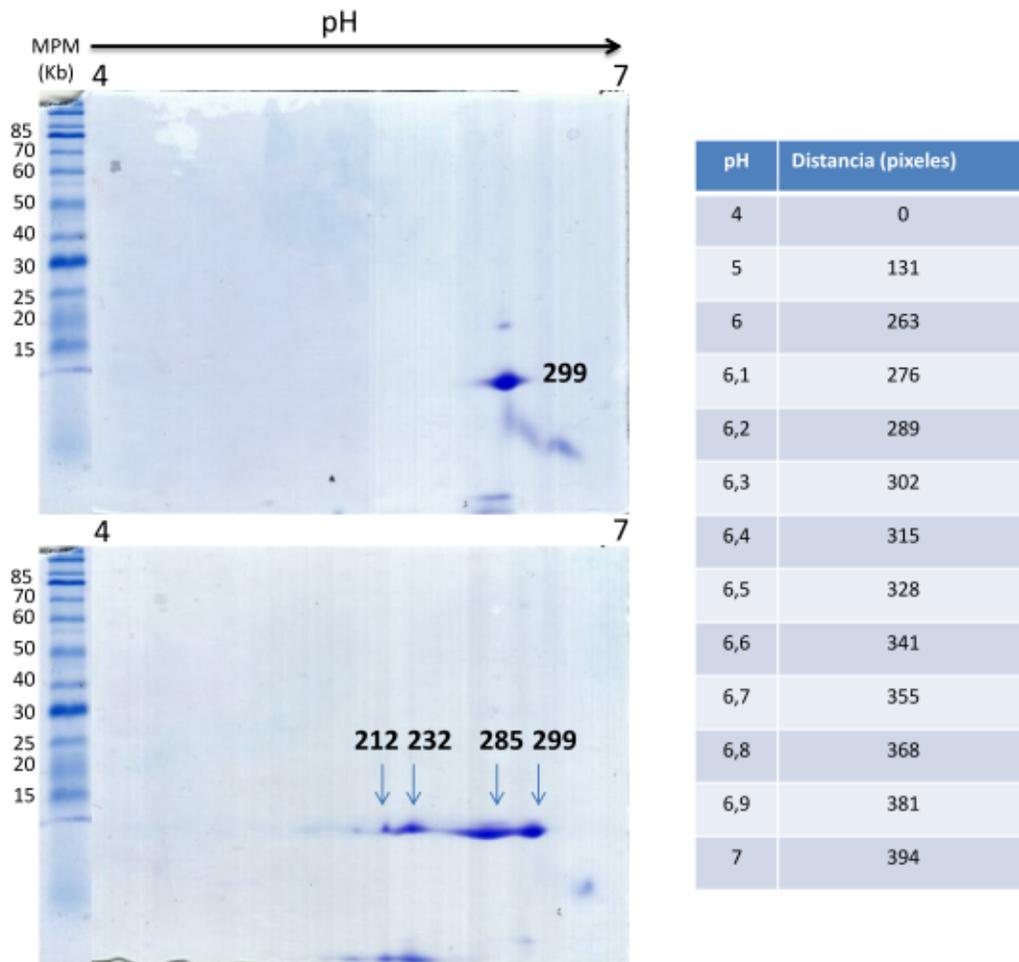


Figura 30: Análisis de la estabilidad de Tpp15 luego de 18 meses de almacenamiento. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15 % correspondientes al isoelectroenfoque realizado con una muestra de Tpp15 recién purificada (superior) y luego de 18 meses de almacenamiento (inferior). Marcador de peso molecular (MPM): Unstained Protein Molecular Weight Marker (Cat #: SM0431), Fermentas.

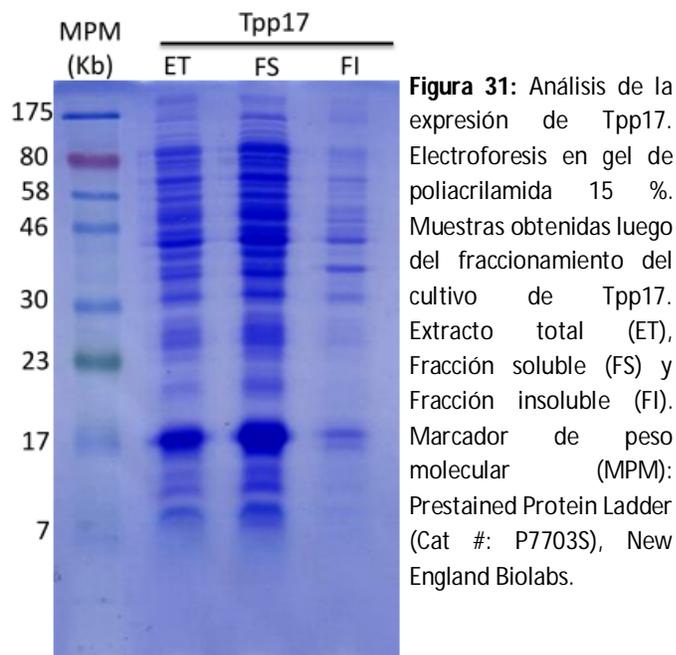
6.2. Tpp17

6.2.1 Expresión de Tpp17

Con el fin de contar con tres antígenos recombinantes para los tests de diagnóstico y la evaluación de la antigenicidad de los mismos se procedió a la expresión de Tpp17.

Para la expresión de Tpp17 se partió de la cepa de *E. coli* BL21(DE3)*Star* previamente transformada con el vector pET22-Tpp17-6His por la Lic. Valeria Echenique. Las condiciones de expresión en medio autoinductor ZYM5052 a 37 °C por 16 horas así como el fraccionamiento fueron puestas a punto por la Lic. Silvia Basso.

Se realizó la expresión de Tpp17 en 200 mL de medio autoinductor ZYM5052 en las condiciones previamente mencionadas. El buffer de lisis utilizado para el fraccionamiento fue Tris-HCl 20 mM pH 7,5 + DTT 5 mM. Se obtuvo un peso húmedo de células de 1,91 g y volúmenes de fracciones soluble e insoluble de 10 mL cada una. Como se observa en la **Figura 31**, la expresión de Tpp17 ocurre en la fracción soluble.



La fracción soluble fue filtrada con filtro de jeringa de 0,45 μm y se le adicionó imidazol hasta una concentración de 10 mM. La proteína fue purificada por IMAC, con una incubación de 30 minutos, un lavado de 10 mL de Tris-HCl 20 mM pH 7,5 + DTT 2 mM + imidazol 10 mM, realizando finalmente la elución con Tris-HCl 20 mM pH 7,5 + DTT 2 mM + imidazol 500 mM (**Figura 32**). El pool de eluciones fue desalado en Tris-HCl 20 mM pH 7,5 + DTT 2 mM y cuantificado utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) (**Anexo A4.1**). A partir de estos resultados se calculó un rendimiento de Tpp17 de **29 mg/L**. Este rendimiento fue superior al obtenido en el trabajo realizado por *Bautigam et al 2013*, el cual fue de 10 mg/L y la expresión de Tpp17 se realizó utilizando como tag de purificación His-SUMO, el cual fue posteriormente removido.

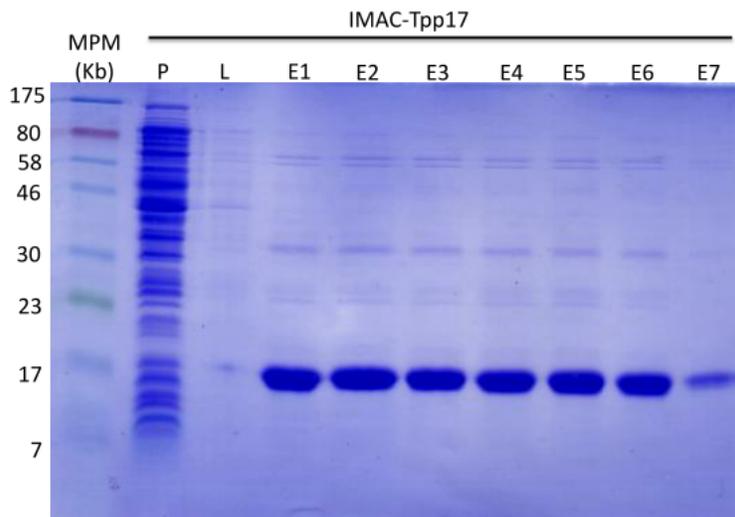
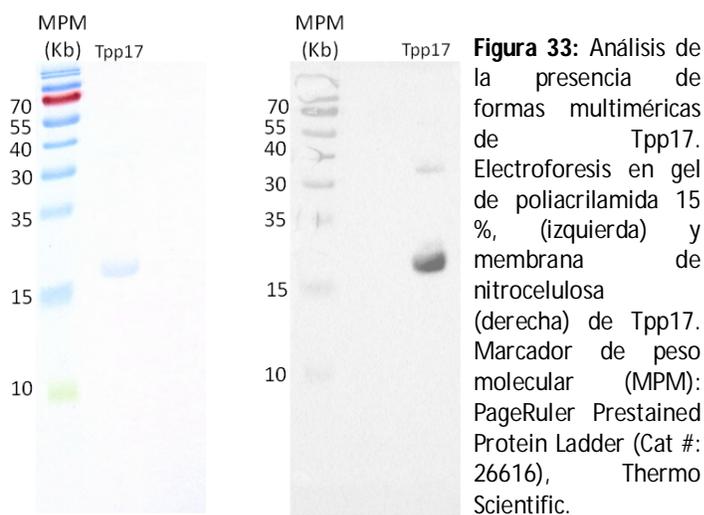


Figura 32: Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida 15 %. Perfil de elución obtenido a partir de la purificación de Tpp17 por IMAC. Percolado (P), Lavado (L), Eluciones 1 a 7 (E1 a E7). Marcador de peso molecular (MPM): Prestained Protein Ladder (Cat #: P7703S), New

En el gel en el cual se muestran las eluciones de Tpp17 de la IMAC (**Figura 32**), además de la banda principal de 17 kDa se observan otras bandas, mayoritariamente de mayor peso molecular al esperado, aunque de mucho menor intensidad que el producto principal. Las mismas pueden corresponder a proteínas de *E. coli* que se unieron de forma inespecífica a la columna Ni-NTA o a formas multiméricas de Tpp17.

6.2.2 Identificación de Tpp17 mediante *western blot*

Si bien la electroforesis están hechas en condiciones desnaturalizantes, algunos datos previos obtenidos por la Lic. Silvia Basso, hacían sospechar que multímeros de Tpp17 resistieran a estas condiciones de desnaturalización. Con el fin de detectar la posible formación de multímeros de Tpp17 presentes luego de la purificación por IMAC, se realizó un ensayo por *western blot* utilizando un anticuerpo anti His-tag. El mismo se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito en Métodos a partir de un gel de poliacrilamida al 15 %. Se sembraron 2,3 μg de Tpp17. En la **Figura 33** se observa el gel de poliacrilamida al 15 % con la muestra de Tpp17, así como también la membrana de nitrocelulosa luego del revelado.



Como se puede observar en el *western blot*, se ve una banda correspondiente a Tpp17 y otra de menor intensidad de mayor tamaño molecular, la cual podría corresponder a la formación de dímeros de Tpp17. Esta formación de dímero ha sido previamente reportada por Brautigam et al, 2013, la cual se establece entre el residuo de Cisteína N-terminal de dos moléculas cuando no es total la reducción de las cisteínas.

6.3. Tpp47

6.3.1 Expresión de Tpp47

Para la expresión de Tpp47-6His se partió de la secuencia optimizada de Tpp47 clonada en el vector de expresión pET22b(+) y transformada en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) Star por la Lic. Camila De Álava. Se evaluaron distintas condiciones de expresión en 200 mL de medio autoinductor ZYM5052, las cuales consisten de la expresión a las siguientes temperaturas: 37 °C, 33 °C, 30 °C y 28 °C por 16 horas, así como también a 20 °C por 20 horas (previo cultivo a 37 °C hasta llegar a una $DO_{600nm}=1$). En cada caso se realizó el fraccionamiento utilizando el buffer de lisis Tris-HCl 20 mM pH 8 + NaCl 0,1 M + DTT 2 mM y una solución de GndCl 5 M + DTT 10 mM para resuspender la fracción insoluble. En la **Tabla 5** se detallan el peso húmedo de células y el volumen de ambas fracciones obtenido en cada caso.

Tabla 5: Peso húmedo de células (g) y volúmenes (mL) de fracciones soluble e insoluble obtenidos a partir de los cultivos

T (°C)	Peso húmedo de células (g)	Volumen (mL)
37	1,84	9,2
33	2,64	12
30	2,86	15
28	2,55	12,5
20	4,81	24,5

En la **Figura 34** se muestran los geles correspondientes a la visualización de las proteínas presentes en las fracciones solubles e insolubles para cada condición ensayada. Como se puede observar, la única condición de expresión a partir de la cual se obtiene a Tpp47 en forma soluble es la realizada a 20 °C, mientras que para las restantes condiciones se expresan en la fracción insoluble en forma de cuerpos de inclusión. Estos resultados son consistentes con el favorecimiento de la expresión en la forma soluble de las proteínas al utilizar menores temperaturas a 37 °C (Jana & Deb, 2005). En este caso puntual, vemos como recién a los 20 °C se logra la expresión en forma soluble, coincidiendo con la temperatura de expresión en forma soluble de Tpp15.

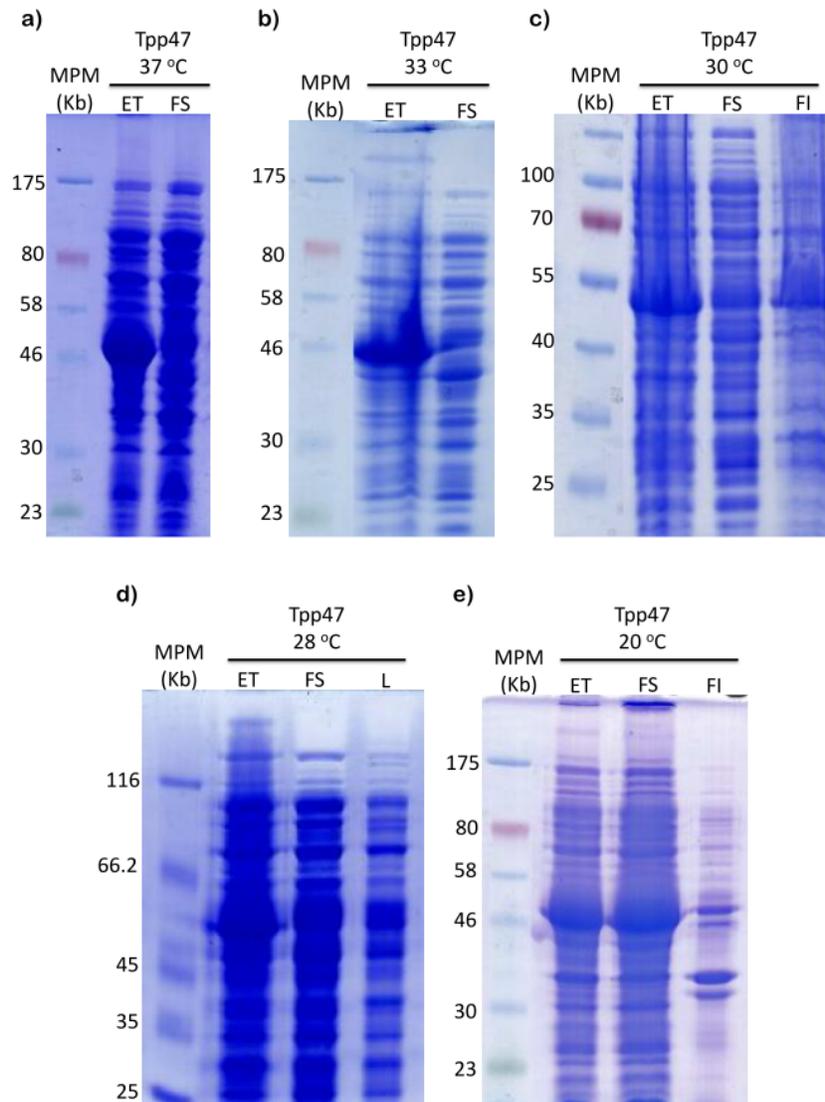
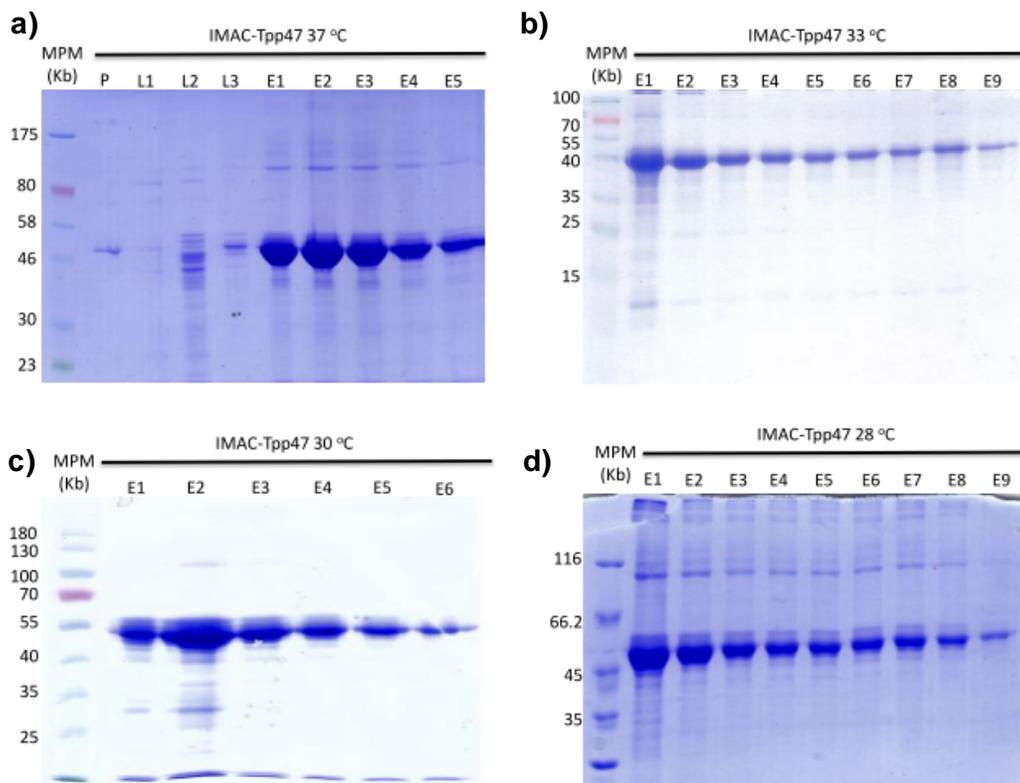


Figura 34: Expresión de Tpp47. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida 10 %. Muestras obtenidas luego del fraccionamiento del cultivo de Tpp47 a 37 °C **(a)**, 33 °C **(b)**, 30 °C **(c)**, 28 °C **(d)** y 20 °C **(e)**. Extracto total (ET), Fracción soluble (FS), Fracción insoluble (FI) y Lavado (L). Marcador de peso molecular (MPM): (a), (b), (e) Prestained Protein Ladder (Cat #: P7703S), New England Biolabs; (c) PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616), Thermo Scientific; (d) Unstained Protein Molecular Weight Marker, (Cat #:SM0431), Fermentas.

6.3.2 Purificación de Tpp47 por IMAC (Ni-NTA) y cromatografía de exclusión molecular

Previo a la purificación de Tpp47 obtenida en forma insoluble, se realizó la solubilización y renaturalización utilizando el Método B mencionado en Métodos. Posteriormente se realizó la purificación por IMAC para todos los casos utilizando un tiempo de adsorción de 1 hora. Luego de la elución del percolado, se realizaron lavados de 10 mL de Tris-HCl 20 mM pH 8 + GndCl 0,5 M, 10 mL de Tris-HCl 20 mM pH 8 seguidos de dos lavados de Tris-HCl 20 mM pH 8 + imidazol 20 mM y Tris-HCl 20 mM pH 8 + imidazol 40 mM en los casos de Tpp47 renaturalizada. Por otro lado, en el caso de Tpp47 obtenida en forma soluble, se realiza un lavado de 10 mL con Tris-HCl 20 mM pH 8 + NaCl 0,1 M + DTT 2 mM seguido de un lavado de 50 mL con Tris-HCl 20 mM pH 8 + imidazol 10 mM. La elución de Tpp47 fue realizada con Tris-HCl 20 mM pH 8 + imidazol 500 mM colectando fracciones de 1 mL (**Figura 35**).



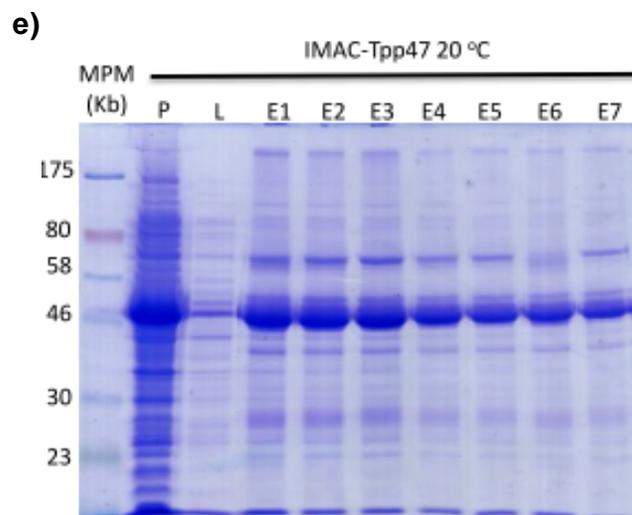


Figura 35: Purificación de Tpp47 por IMAC. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida 10 %. Muestras obtenidas luego de la purificación por IMAC de Tpp47 de los cultivos realizados a (a) 37 °C, (b) 33 °C, (c) 30 °C, (d) 28 °C y (e) 20 °C. Percolado (P), Lavado (L), Eluciones (E). Marcador de peso molecular (MPM): (b) y (c) Prestained Protein Ladder (Cat #: P7703S), New England Biolabs; (a) y (e) PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616), Thermo Scientific; (d) Unstained Protein Molecular Weight Marker, (Cat #:SM0431), Fermentas.

En cada caso, el conjunto de las eluciones fue desalado en Tris-HCl 20 mM pH 8. En todos los casos se cuantificó Tpp47 utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) (**Anexo A5.1-A5.5**). En la **Tabla 6** se presentan los rendimientos obtenidos.

Tabla 6: Rendimientos obtenidos a partir de la purificación de Tpp47 bajo distintas condiciones de expresión.

T (°C)	Rendimiento (mg/L)
37	36
33	13
30	21
28	27
20	27

A partir de estos resultados, se puede ver que a partir de la expresión de Tpp47 a 37 °C se obtuvo un mayor rendimiento, seguido de la expresión a 28 °C y 20 °C. El rendimiento obtenido a partir de la expresión en forma soluble de Tpp47 resultó ser muy similar al reportado por *Tomchik et al 2002*, que es de 25 mg/L y que expresaron a Tpp47 sin el péptido señal al igual que en este trabajo pero con la utilización del tag Streptavidina. Sin embargo, la expresión a 37 °C logró superar el rendimiento reportado en la literatura. A su vez, la estrategia de renaturalización mediante dilución

empleada en Tpp47 ha sido utilizada en muchos trabajos que incluyen proteínas de diversas naturalezas como anticuerpos de cadena única (Cho, Sohn, & Kwak, 2000), tripsinógeno (Hohenblum, Vorauer-uhl, Katinger, & Mattanovich, 2004), lipasas (M. Y. Kim, Kwon, Kim, & Lee, 2007), natokinasa (Ni et al., 2016), entre otros. Lo que resulta importante destacar es el hecho de que en muchas de las estrategias de dilución empleadas en los casos mencionados se requiere de la adición de otro tipo de aditivos como KCl (Cho et al., 2000), CaCl₂ y glutatión (Hohenblum et al., 2004). Sin embargo, la renaturalización de Tpp47 solo requirió de la dilución de la misma en buffer Tris – HCl sin la adición de algún tipo de aditivo.

Mediante este único paso de purificación por IMAC, se ve que para la purificación de Tpp47 a partir de la fracción soluble se requiere de un paso posterior de purificación. Esto último era de esperar, debido al alto contenido de proteínas de la fracción soluble respecto a la insoluble. Es por ello que la proteína obtenida a partir de la fracción soluble fue posteriormente purificada por gel filtración utilizando una columna Hi Load 16/60 Superdex 200 a un flujo de 1 mL/min. El cromatograma y el resultado de una electroforesis en gel de poliacrilamida con las muestras correspondientes a las fracciones de la cromatografía se muestran en la **Figura 36**. El pico de elución de Tpp47 se obtiene a los 55 mL. Las fracciones correspondientes a este pico fueron analizadas por SDS-PAGE, donde puede notarse que se logró separarla de las otras proteínas que habían eluido en la IMAC.

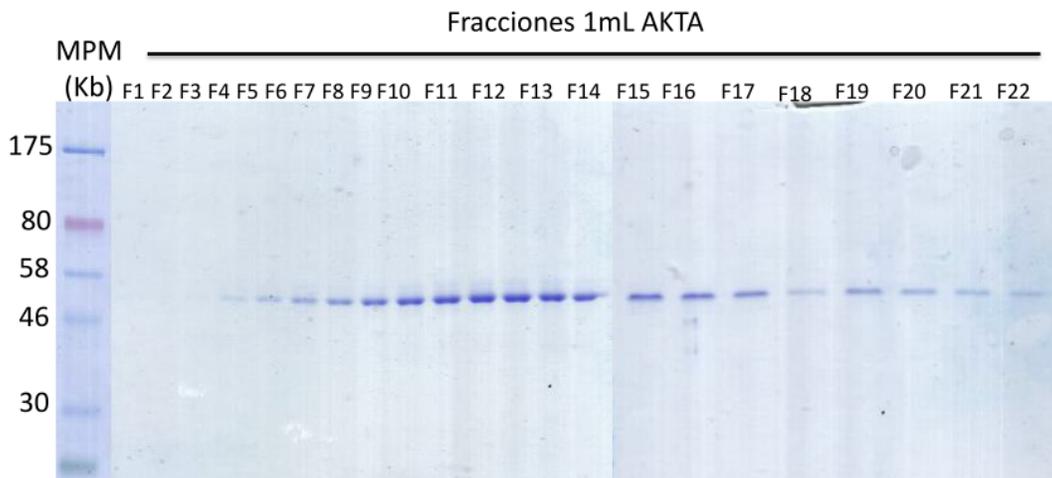
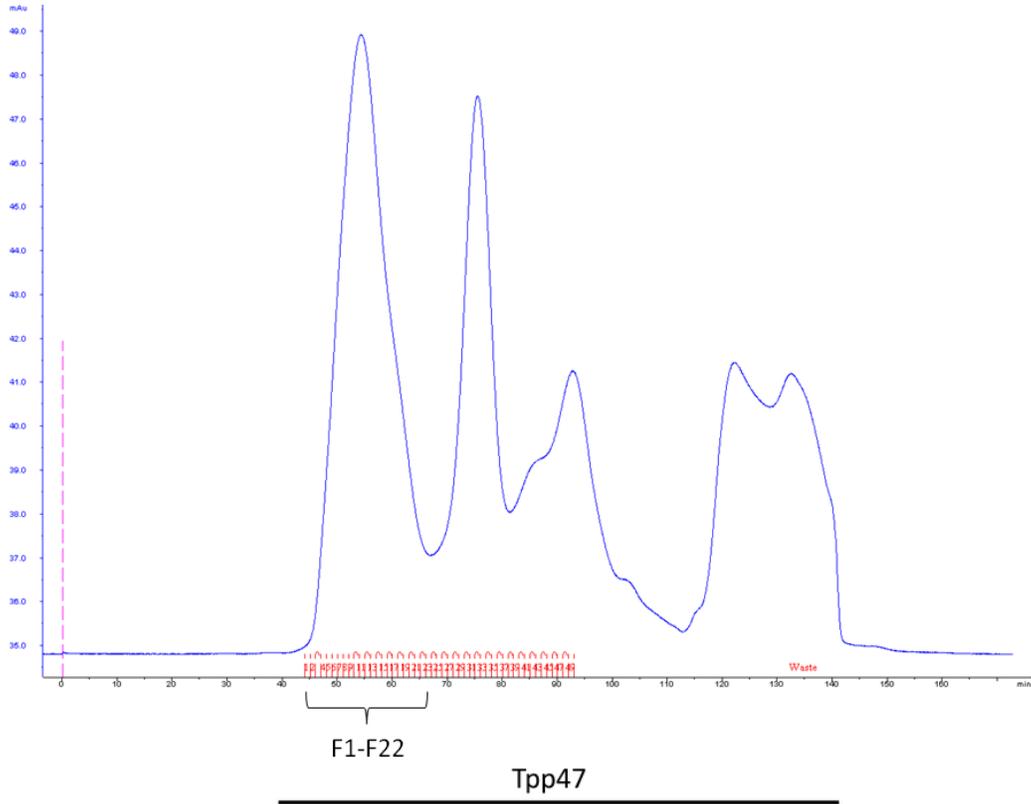


Figura 36: Perfil de elución de Tpp47 por cromatografía de exclusión molecular (arriba). Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida 10 % de las muestras correspondientes a cada fracción (abajo).

6.3.3 Identificación de Tpp47 mediante *western blot*

Con el fin de confirmar la identidad del producto purificado, así como para detectar ya sea la presencia de multímeros o de productos de degradación se realizó un *western blot* de acuerdo al protocolo descrito en Métodos a partir de un gel de poliacrilamida al 10 % con un anticuerpo anti His-Tag. Se sembraron 2,3 μg del producto purificado por IMAC y cromatografía de filtración en gel, y como control negativo se sembró la misma cantidad de BSA. En la **Figura 37** se observa el gel de poliacrilamida al 10 % con las muestras de Tpp47 y BSA analizadas, así como también la membrana de nitrocelulosa luego del revelado con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa.

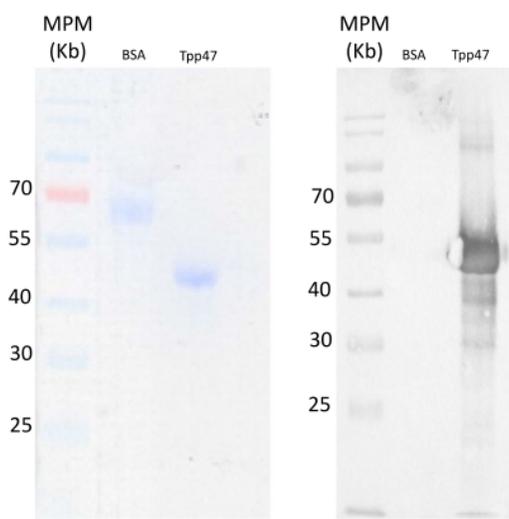


Figura 37: Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida 10 %, (izquierda) y membrana de nitrocelulosa (derecha) de Tpp47 y BSA. Marcador de peso molecular (MPM): PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616), Thermo Scientific.

Como se observa en el *western blot*, aparece una banda que de acuerdo a su peso molecular aparente correspondería a Tpp47. A su vez, se ve en el carril bandas de menor tamaño molecular, que podrían corresponder a productos de degradación de Tpp47 y una de mayor tamaño molecular cercana a los 100 kDa que podría corresponder a un dímero de Tpp47. Las bandas del marcador de peso molecular también se revelan en estas condiciones, lo cual podría deberse a interacciones inespecíficas con los anticuerpos, pero en el carril de la BSA no se detecta señal.

6.3.4 Almacenamiento de Tpp47

Se evaluó la estabilidad de Tpp47 a lo largo del tiempo utilizando las mismas condiciones de almacenamiento que las utilizadas con Tpp15. La concentración de Tpp47 almacenada en cada caso fue de 190 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se tomaron alícuotas a los 5, 7 y 10 meses de almacenamiento. Como se observa en la **Figura 38**, las condiciones de almacenamiento con el buffer Tris-HCl 20 mM pH 8 + DTT 1 mM + EDTA 0,1 mM en presencia y ausencia de Triton X-100, fueron adecuadas para lograr la estabilización de Tpp47 en su almacenamiento. Sin embargo, el almacenamiento en presencia de Glicerol 50 % no resultó ser el adecuado, ya que a los 10 meses se puede observar la presencia de Tpp47 en la fracción precipitada.

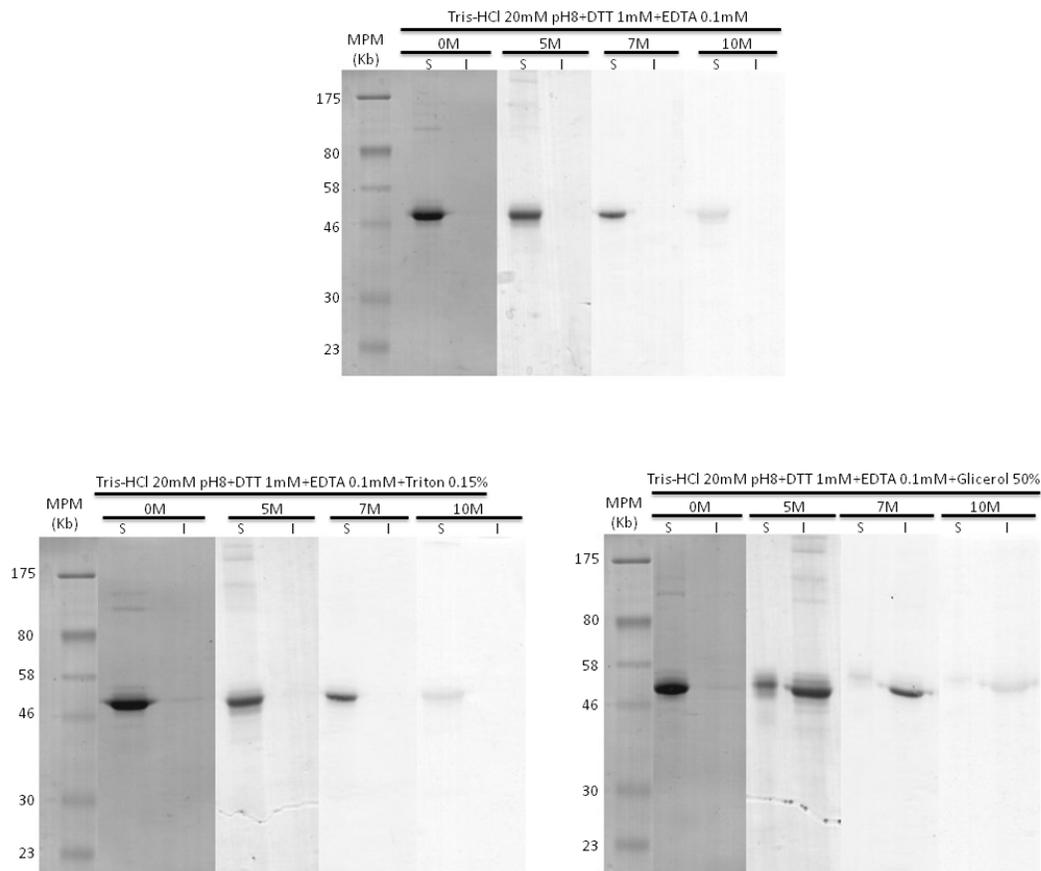


Figura 38: Estabilidad durante el almacenamiento de Tpp47. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida 10 %. En cada caso se detalla el buffer de almacenamiento utilizado, los meses en los cuales se tomaron las alícuotas (0 M, 5 M, 7 M y 10 M), así como también las fracciones solubilizadas (S) e insolubilizadas (I). Marcador de peso molecular (MPM): PageRuler Prestained Protein Ladder (Cat #: 26616), Thermo Scientific.

6.4. Titulación de anticuerpos anti-Tpp15/17/47 en sueros humanos

Con el fin de realizar la detección de anticuerpos específicos anti-Tpp15/Tpp17/Tpp47 en sueros de pacientes infectados con sífilis se realizó una titulación semicuantitativa mediante la técnica ELISA. De esta forma, evaluamos las propiedades antigénicas de los antígenos recombinantes producidos y su adecuación para la utilización en tests de diagnóstico de sífilis en sueros de pacientes.

El título corresponde a la máxima dilución del suero problema que arroja un resultado positivo. Para ello, se debe determinar el cut-off o valor mínimo positivo, que se define como el promedio de los controles negativos más dos desvíos estándar. En este caso, utilizamos como control negativo BSA, con una absorbancia a 420 nm de $0,082 \pm 0,02$ UA, siendo por lo tanto el valor de cut-off de 0,1 UA.

Se analizaron tres sueros de pacientes seronegativos (-2288, -2286 y -1964) y tres sueros de pacientes seropositivos (+32, +16 y +8). En la **Figura 39** se muestra la titulación realizada en los sueros de individuos seronegativos utilizando las tres proteínas recombinantes producidas en este trabajo. Se esperaría observar un valor de absorbancia menor o igual al cut-off establecido (0,1 UA) en todos los casos y en todas las diluciones de sueros realizadas. Sin embargo, en el caso del suero seronegativo -2288 se observan valores de absorbancia superiores al cut-off establecido para las tres proteínas, los cuales corresponden a las diluciones de los sueros 1/50 para Tpp15, 1/50 y 1/100 para Tpp17 y 1/50 a 1/400 para Tpp47. Este comportamiento puede corresponder a la presencia de interacciones inespecíficas con anticuerpos generados en el paciente como consecuencia a la exposición a otra especie de *Treponema* o a reacción cruzada con otro tipo de anticuerpos.

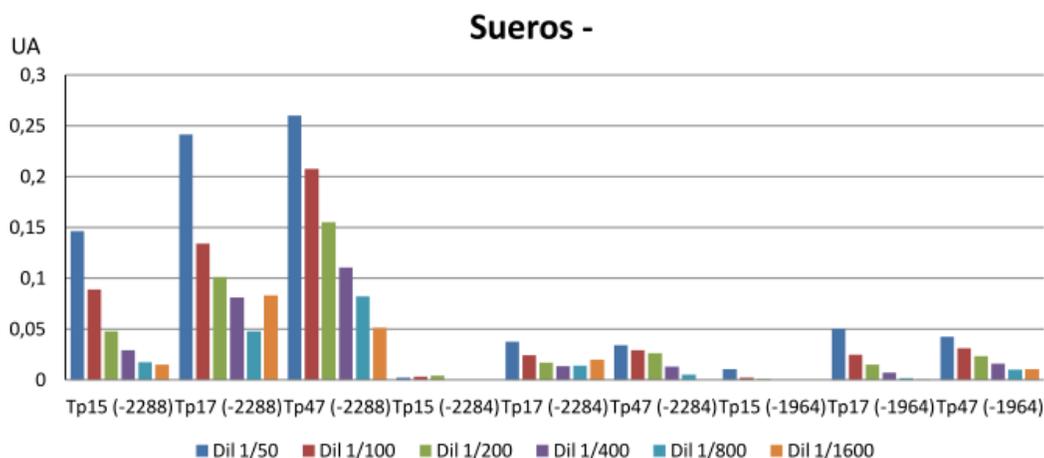


Figura 39: Reactividad de los antígenos Tpp15, Tpp17 y Tpp47 con sueros humanos. Valores de absorbancia obtenidos a partir de la titulación de distintas diluciones de los sueros seronegativos analizados (-2288, -2284 y -1964) utilizando 0,05 µg de Tpp15, Tpp17 y Tpp47.

Al realizar la titulación de los anticuerpos anti-Tpp15/17/47 en sueros de pacientes con sífilis, se observa una mayor reactividad con la Tpp17 recombinante (**Figura 40**).

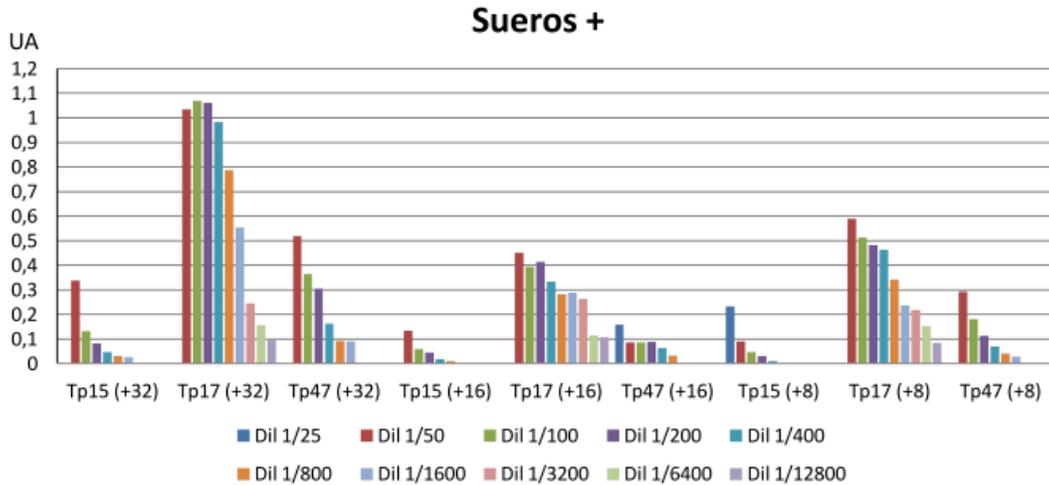


Figura 40: Valores de absorbancia obtenidos a partir de la titulación de distintas diluciones de los sueros seropositivos analizados (+32, +16 y +8) utilizando 0,05 µg de Tpp15, Tpp17 y Tpp47.

En la **Tabla 7** se muestran los títulos de cada proteína en los sueros seropositivos analizados. En los tres sueros se ve un título comparativamente más alto de anticuerpos anti-Tpp17. Por otro lado, se observa que los títulos de anticuerpos anti-Tpp15 y anti-Tpp47 son superiores respecto a los que presentaron los sueros de pacientes negativos. Sin embargo, el título de anticuerpos anti-Tpp15 es superior al de Tpp47 en el suero +16, ocurriendo lo contrario en el suero +8. Esta diferencia en los títulos de anticuerpos anti-Tpp es de esperar ya que previamente se ha estudiado que los títulos anti-Tpp varían según el estadio de la enfermedad en la que se encuentra el paciente. Es por ello que en base a estos resultados podemos suponer que los pacientes a los cuales corresponden los sueros +32 y +8 se encontrarían en etapas similares de la enfermedad.

Tabla 7: Títulos de anticuerpos anti-Tpp15, -Tpp17 y -Tpp47 presentes en los tres sueros de pacientes seropositivos analizados. Los mismos son expresados como la máxima dilución de suero a la cual se detecta un valor de absorbancia superior al cut-off establecido.

Título	Suero +32	Suero +16	Suero +8
Tpp15	100	50	25
Tpp17	12800	12800	6400
Tpp47	400	25	200

En suma, los antígenos recombinantes producidos fueron capaces de detectar semicuantitativamente el nivel diferencial de presencia de anticuerpos anti-Tpp específicos. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por (Gerber, Krell, & Morenz, 1996) en el cual se analizaron titulaciones mediante ELISA con Tpp17 y Tpp47 recombinantes, en los cuales se observa un mayor título de anticuerpos anti-Tpp17 que de anti-Tpp47 en pacientes con sífilis secundaria. A su vez, estos resultados concuerdan con el trabajo realizado por (A. H. Sun, Mao, Hu, Sun, & Yan, 2009) en el cual utilizan Tpp15, Tpp17 y Tpp47 recombinantes para realizar el mismo tipo de ensayo. En este último estudio, se detectaron títulos de anticuerpos anti-Tpp15, anti-Tpp17 y anti-Tpp47 en pacientes con sífilis primaria, latente temprana y secundaria, obteniéndose en los tres casos el mismo comportamiento: mayores títulos de anti-Tpp17, seguido de anti-Tpp15 y anti-Tpp47. Este comportamiento no se cumple en el caso de los sueros +32 y +8, sin embargo, no podemos concluir si se debe a un error experimental ya que carecemos de la información de la etapa de la enfermedad en la cual se encuentran los pacientes de los cuales provienen los sueros. Por lo tanto, para ahondar en la capacidad de detección de anticuerpos anti-Tpp de pacientes con sífilis se tendría que hacer el mismo procedimiento con un mayor número de muestras (tanto de sueros de pacientes con sífilis y sanos) y conocer en qué estadio de la enfermedad se encuentra cada paciente.

7. Conclusiones

El objetivo de este trabajo consistió en la producción de las proteínas recombinantes de *Treponema pallidum subsp pallidum* Tpp15, Tpp17 y Tpp47 en *E. coli* para su utilización en test de diagnóstico de sífilis.

Para ello, se diseñaron y construyeron plásmidos de expresión utilizando las secuencias nucleotídicas codificantes de Tpp17 salvaje (idéntica a la de *T. pallidum*) y las de Tpp15 y Tpp47, las cuales fueron modificadas según el uso de codones de la especie receptora (*E. coli*) junto con otros criterios que buscan condiciones óptimas para la expresión. Con estos plásmidos se generaron cepas de *E. coli* BL21 (DE3) Star que fueron usadas para la producción de estas proteínas recombinantes.

A partir de estudios previos realizados en este laboratorio en los que se había utilizado la secuencia nucleotídica salvaje de Tpp17 (Tpp17wt) en el plásmido de expresión pET22b(+), se habían logrado buenos niveles de expresión en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)Star. Sin embargo, al utilizar la secuencia nucleotídica salvaje de Tpp15 no se había logrado obtener niveles detectables en este mismo sistema de expresión en las condiciones evaluadas (cultivos en medio ZYM-5052 a 37°C y 20°C). Es por ello que, teniendo en cuenta que el uso de codones varía entre distintas especies, se trabajó con una CDS sinónima de Tpp15 en la cual se optimizaron los codones (Tpp15opt) de acuerdo al perfil de utilización de codones de *E. coli*. Al evaluar en paralelo dos condiciones de cultivo diferentes para Tpp15wt y Tpp15opt se observó un cambio drástico en la expresión de la proteína. En efecto, la optimización de la CDS permitió pasar de una situación en la que la producción de proteína era indetectable (Tpp15wt) a una expresión de altos niveles de proteína recombinante (Tpp15opt) Estos resultados apoyan la importancia de adaptar las CDS de las proteínas recombinantes cuando se va a expresar en sistemas ajenos a su naturaleza. Aun así, hay que tener en cuenta que con la optimización de codones no solamente se considera la presencia de codones lentos y rápidos, sino también contenido GC, estabilidad del mRNA, entre otras cosas. Además, el éxito de la optimización de codones depende de la proteína expresada. Teniendo en cuenta estas consideraciones es que decidimos trabajar con la secuencia optimizada de Tpp47 (Tpp47opt) utilizando el mismo plásmido y cepa de *E. coli* de expresión.

Al expresar Tpp15opt a 37°C, la misma formaba cuerpos de inclusión. Por ello, utilizamos una estrategia de solubilización y posterior renaturalización en columna. Teniendo en cuenta que era fácilmente solubilizada a una concentración baja de agente caotrópico (Urea 2 M), nos hacía suponer que la misma se encontraba conservando su estructura secundaria en los cuerpos de inclusión formados (Peternel & Komel, 2011). Esto podría explicar el éxito de la estrategia de renaturalización en columna utilizando gradientes abruptos de Urea hasta lograr la eliminación total del agente caotrópico y la elución de la columna de Ni-NTA. Una de las ventajas de purificar a una proteína a partir de cuerpos de inclusión, es el grado de pureza con el

cual se puede recuperar, algo que vimos en las eluciones de la columna de afinidad. En las mismas, vimos la presencia de la proteína en forma de monómero, dímero y de una proteína que resulta del salto del codón STOP durante la traducción. Este último fenómeno, reportado por (Eggertsson & Soll, 1988), no es raro que haya sucedido, teniendo en cuenta que el plásmido de expresión utilizado era pET22b(+) y que los niveles de expresión de Tpp15opt fueron considerablemente abundantes (rendimiento de 437 mg/L).

Al igual que la expresión de Tpp15opt a 37°C, la expresión a 20°C resultó ser igualmente exitosa. En este caso, se logró la expresión en de la proteína recombinante en la fracción soluble, presentando la ventaja de no necesitar de otros pasos intermediarios en la purificación como lo son la solubilización y la renaturalización. Sin embargo, la expresión en forma soluble presenta mayores desafíos a la hora de purificar a la proteína, ya que se pierde la ventaja de la relativa pureza de la proteína depositada en los cuerpos de inclusión. Las proteínas solubles de *E. coli* son más diversas y más abundantes que las presentes en la fracción insoluble, lo cual implica que puedan interferir más con la purificación por columna de Ni-NTA. Sin embargo, el hecho de haber obtenido también en este caso altos niveles de expresión de Tpp15opt (rendimiento de 600 mg/mL), facilitó el paso de purificación por IMAC, ya que la alta concentración de Tpp15opt impedía que otras proteínas que contienen histidinas puedan competir por los sitios de unión a la columna.

En conclusión, la expresión de Tpp15opt resultó ser exitosa, logrando niveles de expresión elevados y logrando una purificación completa luego de un único paso de purificación. Pero si bien la producción es exitosa, se necesitan determinar las condiciones adecuadas de almacenamiento para lograr que el stock de proteínas producido permanezca estable para su utilización en los ensayos de diseño de test de diagnóstico. Es por esto, que evaluamos la estabilidad a lo largo del tiempo (un año) de Tpp15opt utilizando distintos buffers de almacenamiento comúnmente empleados. Las tres condiciones ensayadas resultaron ser exitosas, observándose una degradación insignificante en el último mes de evaluación. Esta versatilidad permite por lo tanto, seleccionar de esas condiciones de almacenamiento la más adecuada para los ensayos de diseño de test de diagnóstico, permitiendo producir un stock y asegurar su estabilidad por el período de tiempo evaluado. Sin embargo, como se vio en la electroforesis bidimensional, en las condiciones de almacenamiento en glicerol, se observaron spots de diferente punto isoeléctrico, lo cual puede indicar que luego de un período de 18 meses (tiempo de almacenamiento que presentaba la muestra analizada), la proteína sufre modificaciones post-traduccionales como consecuencia de la alta concentración de glicerol presente en el buffer de almacenamiento. Este efecto de modificaciones químicas por parte de altas concentraciones de glicerol ha sido previamente reportado (Gang Xing, Junmei Zhang, Yue Chen, 2010). Sería recomendable por lo tanto, estudiar en paralelo la estabilidad mediante gel de

electroforesis desnaturalizante, el perfil obtenido por electroforesis bidimensional para tener en cuenta este tipo de modificaciones químicas, ya que pueden llegar a influenciar el reconocimiento antígeno recombinante-anticuerpo anti-Tpp en los tests de diagnóstico.

Posteriormente se evaluaron diferentes condiciones de expresión y de purificación de las proteínas recombinantes. En aquellos casos en que la expresión fue en forma de cuerpos de inclusión (Tpp15opt y Tpp47opt a 37°C), se evaluaron diferentes condiciones de renaturalización. Para la producción de Tpp47opt se evaluaron diversas temperaturas de expresión utilizando el mismo medio de cultivo, vector y cepa de expresión de *E. coli* que para Tpp15opt y Tpp17wt en la búsqueda por las condiciones que puedan generar el mayor nivel de expresión de Tpp47opt, que no resultó ser tan significativo como con Tpp15opt. Aquí se ve lo mencionado previamente en cuanto a la optimización de codones, la misma no asegura un alto nivel de expresión y depende de forma específica de la proteína. En aquellos casos en que la expresión se dio a nivel de cuerpos de inclusión (37°C, 33°C, 30°C y 28°C) se utilizó un agente caotrópico más fuerte que Urea para lograr solubilizar a Tpp47opt, como lo es el Cloruro de Guanidinio. Esto se determinó por ensayos preliminares de solubilización con Urea (datos no mostrados). En este caso vemos una característica de los cuerpos de inclusión: la composición de los mismos varía de acuerdo a la proteína, pudiendo estar la misma en su forma prácticamente nativa como ocurre en el caso de Tpp15opt o prácticamente desplegada, como puede ser el caso de Tpp47opt debido a la dificultad en cuanto a la solubilización de la misma. A diferencia de la estrategia de renaturalización utilizada para Tpp15opt, la estrategia seleccionada para Tpp47opt fue por dilución rápida, la cual resultó exitosa, ya que a partir de una estructura completamente desplegada de Tpp47opt pudimos lograr obtener su plegamiento correcto, el cual evaluamos por la solubilidad de la misma. Los perfiles de elusión de Tpp47opt por IMAC no fueron tan puros como los de Tpp15opt. Esto puede estar relacionado con la relación entre la cantidad de proteína recombinante expresada y la unión a la resina, como se discutió previamente en el caso de Tpp15opt. En el caso puntual de Tpp47opt, los niveles de expresión fueron menores, no llegando a saturar la capacidad de la resina y por lo tanto puede ser una opción utilizar menor volumen de resina. A su vez, hay que tener en cuenta la afinidad de unión del tag de histidinas a la resina que puede verse influenciada por la relación entre la estructura de la proteína y en consecuencia la orientación que adquiere el tag de histidinas, pudiendo dejarlo menos expuesto para la interacción con la resina de Ni-NTA. El mayor rendimiento obtenido de Tpp47opt en su forma insoluble fue obtenido a 37°C (36 mg/mL). Por otro lado, un rendimiento cercano a éste se obtuvo a partir de la expresión de 20°C, siendo de 27 mg/mL. Esta expresión en forma soluble tiene la ventaja de evitar el manejo de grandes volúmenes de proteína diluida (para la renaturalización por dilución se hace una dilución 1/10 de la fracción insoluble resuspendida en Cloruro de Guanidinio 5 M), lo cual resulta ser muy trabajoso si queremos adaptar la producción de estas proteínas

para su utilización a nivel industrial. Sin embargo, para la obtención de Tpp47opt pura se requiere de un posterior paso de purificación como cromatografía de gel filtración.

El análisis de estabilidad de Tpp47opt en las mismas condiciones que Tpp15opt arrojaron distintos resultados. Antes que nada, hay que tener en cuenta que las concentraciones utilizadas para evaluar la estabilidad de Tpp15opt y Tpp47opt fueron notoriamente diferentes (9 mg/mL y 190 µg/mL, respectivamente). De las tres condiciones evaluadas, dos resultaron adecuadas para el almacenamiento de Tpp47opt, ya que en el tiempo evaluado (10 meses) solo el almacenamiento en buffer con glicerol comenzó a presentar una precipitación de la proteína a partir del mes 5. Este resultado puede ser consecuencia de la baja concentración de proteína almacenada, debiendo evaluar en posteriores trabajos mayores concentraciones de Tpp47opt, que rondan 1 mg/mL por ejemplo.

Luego de haber logrado la optimización de la expresión y purificación de Tpp15opt, Tpp17wt y Tpp47opt, el siguiente paso consistió en evaluar la capacidad antigénica de estas proteínas recombinantes para su uso en test de diagnóstico de sífilis. Para ello realizamos titulaciones semicuantitativas de anticuerpos anti-Tpp en sueros humanos. De esta forma pudimos evaluar la capacidad de cada antígeno producido para detectar los niveles diferenciales de anticuerpos anti-Tpp específicos producidos en los pacientes con sífilis. Hay que tener en cuenta que ha sido reportado que según la etapa de sífilis en la cual se encuentre el paciente predomina un anticuerpo anti-Tpp más que otros (R. Sun, Lai, Ren, Lian, & Zhang, 2013). En nuestros resultados vimos que en los tres sueros seropositivos analizados el mayor título corresponde a Tpp17wt, mientras que los títulos de Tpp15opt y Tpp47opt varían de acuerdo al suero considerado. Esto nos hace suponer que los pacientes se encuentran en etapas diferentes de la enfermedad. A su vez, es importante destacar la capacidad de los antígenos producidos para detectar anticuerpos específicos para cada uno de ellos.

8. Bibliografía

- Akins, D. R., Purcell, B. K., Mitra, M. M., Norgard, M. V., & Radolf, J. D. (1993). Lipid modifications of the 17-kilodalton membrane immunogen of *Treponema pallidum* determines macrophage activation as well as amphiphilicity. *Infection and Immunity*, 61(4), 1202–1210.
- Alderete, J. F., & Baseman, J. B. (1981). Analysis of serum IgG against *Treponema pallidum* protein antigens in experimentally infected rabbits. *British Journal of Venereal Diseases*, 57(5), 302–308.
- Arroll, T. W., Centurion-Lara, A., Lukehart, S. A., & Van Voorhis, W. C. (1999). T-cell responses to *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* antigens during the course of experimental syphilis infection. *Infection and Immunity*, 67(9), 4757–4763.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Babolin, C., Amedei, A., Ozolins, D., Zilevica, A., D'Elis, M. M., & de Bernard, M. (2011). TpF1 from *Treponema pallidum* activates inflammasome and promotes the development of regulatory T cells. *Journal of Immunology*, 187(3), 1377–84. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1100615>
- Backhouse, J. L., & Nesteroff, S. I. (2001). *Treponema pallidum* western blot : Comparison with the FTA-ABS test as a confirmatory test for syphilis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 39(1), 9–14.
- Baker-Zander, S. A., & Lukehart, S. A. (1992). Macrophage-mediated killing of opsonized *Treponema pallidum*. *The Journal of Infectious Diseases*, 165(1), 69–74.
- Baker-zander, S. A., Shaffer, J. M., & Lukehart, S. A. (1993). VDRL Antibodies Enhance Phagocytosis of *Treponema pallidum* by Macrophages. *Journal of Infectious Diseases*, 167(5), 1100–1105.
- Baker-Zander, S., & Sell, S. (1980). A Histopathologic and Immunologic Study of the Course of Syphilis in the Experimentally Infected Rabbit. *American Journal of Pathology*, 101(2), 387–414.
- Baughn, R. E., Jorizzo, J. L., Adams, C. B., & Musher, D. M. (1988). Ig Class and IgG Subclass Responses to *Treponema pallidum* in Patients with Syphilis. *Journal of Clinical Immunology*, 8(2), 128–139.
- Blanco, D. R., Reimann, K., Skare, J., Champion, C. I., Foley, D., Exner, M. M., ... Lovewt, M. A. (1994). Isolation of the Outer Membranes from *Treponema pallidum* and *Treponema vincentii*. *Journal of Bacteriology*, 176(19), 6088–6099.
- Bocoum, F. Y., Ouédraogo, H., Tarnagda, G., Kiba, A., Tiendrebeogo, S., Bationo, F., ... Kouanda, S. (2015). Evaluation of the diagnostic performance and operational characteristics of four rapid immunochromatographic syphilis tests in Burkina Faso. *African Health Sciences*, 15(2), 1–4.
- Brautigam, C. A., Deka, R. K., Liu, W. Z., & Norgard, M. V. (2015). Insights into the potential function and membrane organization of the TP0435 (Tp17) lipoprotein from *Treponema pallidum* derived from structural and biophysical analyses. *Protein Science*, 24(1), 11–19. <http://doi.org/10.1002/pro.2576>
- Byrne, R. E., Laska, S., Bell, M., Larson, D., Phillips, J., & Todd, J. (1992). Evaluation of a

- Treponema pallidum Western Immunoblot Assay as a Confirmatory Test for Syphilis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 30(1), 115–122.
- Centurion-Lara, A., Molini, B. J., Godornes, C., Sun, E., Hevner, K., Van Voorhis, W. C., & Lukehart, S. A. (2006). Molecular differentiation of *Treponema pallidum* subspecies. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3377–3380. <http://doi.org/10.1128/JCM.00784-06>
- Cha, J. Y., Ishiwata, A., & Mobashery, S. (2004). A Novel β -Lactamase Activity from a Penicillin-binding Protein of *Treponema pallidum* and Why Syphilis Is Still Treatable with Penicillin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 14917–14921. <http://doi.org/10.1074/jbc.M400666200>
- Chamberlain, N. R., Brandt, M. E., Erwin, A. L., Radolf, J. D., & Norgardl, M. V. (1989). Major Integral Membrane Protein Immunogens of *Treponema pallidum* Are Proteolipids. *Infection and Immunity*, 57(9), 2872–2877.
- Cho, W., Sohn, U., & Kwak, J. (2000). Production and in vitro refolding of a single-chain antibody specific for human plasma apolipoprotein A-I. *Journal of Biotechnology*, 77(2), 169–178.
- Cox, D. L., Luthra, A., Dunham-Ems, S., Desrosiers, D. C., Salazar, J. C., Caimano, M. J., & Radolf, J. D. (2010). Surface immunolabeling and consensus computational framework to identify candidate rare outer membrane proteins of *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*, 78(12), 5178–5194. <http://doi.org/10.1128/IAI.00834-10>
- Deka, R. K., Brautigam, C. A., Tomson, F. L., Lumpkins, S. B., Tomchick, D. R., Machius, M., & Norgard, M. V. (2007). Crystal structure of the Tp34 (TP0971) lipoprotein of *Treponema pallidum*: Implications of its metal-bound state and affinity for human lactoferrin. *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5944–5958. <http://doi.org/10.1074/jbc.M610215200>
- Deka, R. K., Machius, M., Michael, V., Tomchick, D. R., Deka, R. K., Machius, M., ... Tomchick, D. R. (2002). Crystal Structure of the 47-kDa Lipoprotein of *Treponema pallidum* Reveals a Novel Penicillin-binding Protein Crystal Structure of the 47-kDa Lipoprotein of *Treponema pallidum*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41857–41864. <http://doi.org/10.1074/jbc.M207402200>
- Diaz, T., Gloria, M. De, Almeida, B., Georg, I., Maia, S. D. C., Souza, R. V. De, & Markowitz, L. E. (2004). Evaluation of the Determine Rapid Syphilis TP Assay Using Sera. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11(1), 98–101. <http://doi.org/10.1128/CDLI.11.1.98>
- Ebel, A., Vanneste, L., Cardinaels, M., Sablon, E., Samson, I., Bosschere, K. D. E., ... Zrein, M. (2000). Validation of the INNO-LIA Syphilis Kit as a Confirmatory Assay for *Treponema pallidum* Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 215–219.
- Eggertsson, G., & Soll, D. (1988). Transfer Ribonucleic Acid-Mediated Suppression of Termination Codons in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 52(3), 354–374.
- Egglestone, S. I. (2000). Serological diagnosis of syphilis. *Commun Dis Public Health*, 3(3), 158–162.
- Fitzgerald, T. J. (1987). Activation of the classical and alternative pathways of complement by *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* and *Treponema vincentii*. *Infection and Immunity*, 55(9), 2066–2073.

- Fitzgerald, T. J. (1989). Pathogenesis and. *Annual Review of Microbiology*, 35, 29–54.
- Franks, F. (1993). Storage stabilization of proteins. In *Protein Biotechnology* (pp. 489–532).
- Gang Xing, Junmei Zhang, Yue Chen, and Y. Z. (2010). Identification of Four Novel Types of in Vitro Protein Modifications. *J Proteome Res*, 7(10), 4603–4608. <http://doi.org/10.1021/pr800456q>.Identification
- George, R. (1998). An analysis of the value of some antigen-antibody interactions used as diagnostic indicators in a treponemal Western blot (TWB) test for syphilis. *J Clin Lab Immunol*, 50(1), 27–44.
- Gerber, A., Krell, S., & Morenz, J. (1996). Recombinant *Treponema pallidum* antigens in syphilis serology. *Immunobiology*, 196(5), 535–49. [http://doi.org/10.1016/S0171-2985\(97\)80070-8](http://doi.org/10.1016/S0171-2985(97)80070-8)
- Haake, D. A. (2009). Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology*, 146(Pt 7), 1491–1504.
- Healthcare, G. E., & Sciences, L. (2013). Helping you build a smarter diagnostic assay Helping you build a smarter diagnostic assay.
- Herring, A. J. (2006). A multi-centre evaluation of nine rapid, point-of-care syphilis tests using archived sera. *Sex Transm Infectol*, 82, 7–12. <http://doi.org/10.1136/sti.2006.022707>
- Hohenblum, H., Vorauer-uhl, K., Katinger, H., & Mattanovich, D. (2004). Bacterial expression and refolding of human trypsinogen. *Journal of Biotechnology*, 109(1), 3–11. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.10.022>
- Immunogen, D. S., Chamberlain, N. R., Radolf, J. D., Hsu, P., Sell, S., & Norgardl, M. V. (1988). Genetic and Physicochemical Characterization of the Recombinant *Treponema pallidum* subsp . *pallidum*. *Microbiology*, 56(1), 71–78.
- Izard, J., Renken, C., Hsieh, C. E., Desrosiers, D. C., Dunham-Ems, S., La Vake, C., ... Radolf, J. D. (2009). Cryo-electron tomography elucidates the molecular architecture of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Journal of Bacteriology*, 191(24), 7566–7580. <http://doi.org/10.1128/JB.01031-09>
- Jana, S., & Deb, J. K. (2005). Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(3), 289–298. <http://doi.org/10.1007/s00253-004-1814-0>
- Jiang, C., Zhao, F., Xiao, J., Zeng, T., Yu, J., Ma, X., ... Wu, Y. (2013). Evaluation of the recombinant protein TpF1 of *Treponema pallidum* for serodiagnosis of syphilis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(10), 1563–1568. <http://doi.org/10.1128/CVI.00122-13>
- Kelesidis, T. (2014). The cross-talk between spirochetal lipoproteins and immunity, 5(June), 85–88. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00310>
- Kim, H., Lee, S., Park, H., & Jeon, S. (2015). Expression , refolding , and characterization of a small laccase from *Thermus thermophilus* HJ6. *Protein Expression and Purification*, 114(1), 37–43. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2015.06.004>
- Kim, M. Y., Kwon, J. S., Kim, H. J., & Lee, E. K. (2007). In vitro refolding of PEGylated lipase. *Journal of Biotechnology*, 131(2), 177–179. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.06.016>

- Kuznik, A., Muhumuza, C., Komakech, H., Marques, E. M. R., & Lamorde, M. (2015). Antenatal Syphilis Screening Using Point-Of-Care Testing in Low- and Middle-Income Countries in Asia and Latin America : A Cost- Effectiveness Analysis, *53*, 1–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0127379>
- Lafond, R. E., Lukehart, S. A., Lafond, R. E., & Lukehart, S. A. (2006). Biological Basis for Syphilis, *19*(1). <http://doi.org/10.1128/CMR.19.1.29>
- Larsen, S. A., Steiner, B. M., & Rudolph, A. H. (1995). Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis, *8*(1), 1–21.
- Li, J., Zheng, H. Y., Wang, L. N., Liu, Y. X., Wang, X. F., & Liu, X. R. (2009). Clinical evaluation of four recombinant *Treponema pallidum* antigen-based rapid diagnostic tests for syphilis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, *23*(6), 648–650. <http://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2008.03102.x>
- Liu, J., Howell, J. K., Bradley, S. D., Zheng, Y., Zhou, Z. H., & Norris, S. J. (2010). Cellular Architecture of *Treponema pallidum*: Novel Flagellum, Periplasmic Cone, and Cell Envelope as Revealed by Cryo Electron Tomography. *Journal of Molecular Biology*, *403*(4), 546–561. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.020>
- Liu, S. Q., Wang, S. P., Wu, Y. M., Zhao, F. J., Zeng, T. B., Zhang, Y. J., ... Gao, D. M. (2010). Production of proinflammatory cytokines in the human THP-1 monocyte cell line following induction by Tp0751, a recombinant protein of *Treponema pallidum*. *Science China Life Sciences*, *53*(2), 229–233. <http://doi.org/10.1007/s11427-010-0038-z>
- Loeffelholz MJ. (2012). It Is Time To Use *Treponema*-Specific Antibody Screening Tests for. *J Clin Microbiol*, *50*(1), 2–6. <http://doi.org/10.1128/JCM.06347-11>
- Lukehart, S. A. (1986). Characterization of the humoral immune response of the rabbit to antigens of *Treponema pallidum* after experimental infection and therapy. *Sexually Transmitted Diseases*, *13*(1), 9–15.
- MacBeath, K., & Kast, P. (1998). UGA Read-Through Artifacts—When Popular Gene Expression Systems Need a pATCH. *BioTechniques*, *794*(May), 789–794.
- Marangoni, A. (1999). IgG western blot as a confirmatory test in early syphilis. *Zentralbl Bakteriol*, *289*(2), 125–133.
- McGill, M. A., Edmondson, D. G., Carroll, J. A., Cook, R. G., Orkiszewski, R. S., & Norris, S. J. (2010). Characterization and serologic analysis of the *treponema pallidum* proteome. *Infection and Immunity*, *78*(6), 2631–2643. <http://doi.org/10.1128/IAI.00173-10>
- Miranda, A. P. F. De, & Sato, N. S. (2008). Profile of anti-Tp47 antibodies in patients with positive serology for syphilis analyzed by Western Blot. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases : An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, *12*(2), 139–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18641851>
- Morshed, M. G., & Singh, E. (2015). Recent Trends in the Serologic Diagnosis of Syphilis, *22*(2), 137–147. <http://doi.org/10.1128/CVI.00681-14>
- Newman, L., Kamb, M., Hawkes, S., Gomez, G., Say, L., Seuc, A., & Broutet, N. (2013). Global Estimates of Syphilis in Pregnancy and Associated Adverse Outcomes : Analysis of Multinational Antenatal Surveillance Data. *PLoS ONE*, *10*(2). <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001396>

- Ni, H., Guo, P.-C., Jiang, W.-L., Fan, X.-M., Luo, X.-Y., & Li, H.-H. (2016). Expression of nattokinase in *Escherichia coli* and renaturation of its inclusion body. *Journal of Biotechnology*, *231*(1), 65–71. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.034>
- NICHOLS, H. J. (1913). DEMONSTRATION OF SPIROCHAETA PALLIDA IN THE CEREBROSPINAL FLUID. *JAMA*, *60*(2), 108–110.
- Niemitalo, O., Neubauer, A., Liebal, U., Myllyharju, J., Juffer, H., & Neubauer, P. (2005). Modelling of translation of human protein disulfide isomerase in *Escherichia coli* — A case study of gene optimisation. *Journal of Biotechnology*, *120*(1), 11–24. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.05.028>
- Norgard, M. V., Chamberlain, N. R., Swancutt, M. A., & Goldberg, M. S. (1986). Cloning and expression of the major 47-kilodalton surface immunogen of *Treponema pallidum* in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, *54*(2), 500–506.
- Norris, S. J. (1993). Polypeptides of *Treponema pallidum* : Progress toward Understanding Their Structural , Functional , and Immunologic Rolest. *Microbiological Reviews*, *57*(3), 750–779.
- Odunuga, O. O., Adekoya, O. A., & Sylte, I. (2015). High-level expression of pseudolysin , the extracellular elastase of *Pseudomonas aeruginosa* , in *Escherichia coli* and its purification. *Protein Expression and Purification*, *113*(1), 79–84. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2015.05.005>
- Oeser, T., Wei, R., Baumgarten, T., Billig, S., Föllner, C., & Zimmermann, W. (2010). High level expression of a hydrophobic poly (ethylene terephthalate) -hydrolyzing carboxylesterase from *Thermobifida fusca* KW3 in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Journal of Biotechnology*, *146*(3), 100–104. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.02.006>
- Peeling, R. W., Holmes, K. K., & Mabey, D. (2006). Rapid tests for sexually transmitted infections (STIs): the way forward. <http://doi.org/10.1136/sti.2006.024265>
- Peeling, R. W., & Ye, H. (2004). Diagnostic tools for preventing and managing maternal and congenital syphilis : an overview. *Bull World Health Organ*, *008086*(03).
- Penn, C. W. (1987). Pathogenicity and immunobiology of. *Journal of Medical Microbiology*, *24*, 1–9.
- Peternel, Š., & Komel, R. (2011). Active Protein Aggregates Produced in *Escherichia coli*. *Int J Mol Scie*, 8275–8287. <http://doi.org/10.3390/ijms12118275>
- Petrosová, H. (2013). Resequencing of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* Strains Nichols and SS14: Correction of Sequencing Errors Resulted in Increased Separation of Syphilis *Treponeme* Subclusters. *PLoS ONE*, *8*(9), 1–8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0074319>
- Petti, C. A., Polage, C. R., Quinn, T. C., Ronald, A. R., & Sande, M. A. (2006). Laboratory Medicine in Africa : A Barrier to Effective Health Care. *Clinical Infectious Diseases*, *42*, 377–382.
- Ppits, D.-. (2010). Informe epidemiológico ITS-VIH / SIDA Dirección General de la Salud, 1–20.
- Promnares, K., Junkree, S., Day, N. P. J., & Imwong, M. (2015). Efficient in vitro refolding and functional characterization of recombinant human liver carboxylesterase (CES1)

- expressed in *E. coli*. *Protein Expression and Purification*, 107(1), 68–75.
<http://doi.org/10.1016/j.pep.2014.11.006>
- Purcell, B. K., Chamberlain, N. R., Goldberg, M. S., Andrews, L. P., Robinson, E. J., Norgard, M. V., & Radolf, J. D. (1989). Molecular cloning and characterization of the 15-kilodalton major immunogen of *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*, 57(12), 3708–3714.
- Purcell, B. K., Swancutt, M. A., & Radolf, J. D. (1990). Lipid modification of the 15 kiloDalton major membrane immunogen of *Treponema pallidum*. *Molec. Microbiol.*, 4(4), 1371–1379.
- Radolf, J. D. (1994). Role of outer membrane architecture in immune evasion by *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi*. *Trends in Microbiology*, 2(9), 307–311.
[http://doi.org/10.1016/0966-842X\(94\)90446-4](http://doi.org/10.1016/0966-842X(94)90446-4)
- Radolf, J. D., & Desrosiers, D. C. (2009). *Treponema pallidum*, the stealth pathogen, changes, but how?: MicroCommentary. *Molecular Microbiology*, 72(5), 1081–1086.
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06711.x>
- Radolf, J. D., Goldberg, M. S., Bourell, K., Baker, S. I., Jones, J. D., & Norgard, M. V. (1995). Characterization of outer membranes isolated from *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. Characterization of Outer Membranes Isolated from *Borrelia burgdorferi*, the Lyme Disease Spirochete. *Infection and Immunity*, 63(11), 4244–4252.
- Ratnam, S., & Fccm, M. P. H. (2005). The laboratory diagnosis of syphilis, 16(1), 45–51.
- Report on global sexually transmitted infection surveillance 2013. (2013).
- Riviere, G. R., Thomas, D. D., & Cobb, C. M. (1989). In vitro model of *Treponema pallidum* invasiveness. *Infection and Immunity*, 57(8), 2267–2271.
- Rodgers, G. C., Laird, W. J., Coates, S. R., Mack, D. H., Huston, M., & Sninsky, J. J. (1986). Serological Characterization and Gene Localization of an *Escherichia coli*-Expressed 37-Kilodalton *Treponema pallidum* Antigen. *Infect Immun*, 53(1), 16–25.
- Salazar, J. C. (2002). The immune response to infection with *Treponema pallidum*, the stealth pathogen. *Microbes and Infection*, 4(11), 1133–1140.
- Salazar, J. C., Pope, C. D., Moore, M. W., Pope, J., Kiely, T. G., & Radolf, J. D. (2005). Lipoprotein-Dependent and -Independent Immune Responses to Spirochetal Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(8), 949–958.
<http://doi.org/10.1128/CDLI.12.8.949>
- Sambri, V., Marangoni, A., Eyer, C., Reichhuber, C., Soutschek, E., Negosanti, M., ... Cevenini, R. (2001). Western immunoblotting with five *Treponema pallidum* recombinant antigens for serologic diagnosis of syphilis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(3), 534–9.
<http://doi.org/10.1128/CDLI.8.3.534-539.2001>
- Sarioglu, H., Lottspeich, F., Walk, T., & Eckerskorn, C. (2000). Deamidation as a widespread phenomenon in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of human blood plasma proteins Proteomics and 2-DE. *Electrophoresis*, 21, 2209–2218.
- Sato, N. S., & Paulo, S. (1995). *Laboratorial Diagnosis of Syphilis*, 87-108.
- Schmid, G. P., Ms, C., Stoner, B. P., Hawkes, S., & Broutet, N. (2007). The Need and Plan for

- Global Elimination of Congenital Syphilis. *Sexually Transmitted Diseases*, 34(7), 5–10. <http://doi.org/10.1097/01.olq.0000261456.09797.1b>
- Schroder, N. W. (2008). Immune responses induced by spirochetal outer membrane lipoproteins and glycolipids. *Immunobiology*, 213(3), 329–340.
- Simpson, R. J. (2015). Stabilization of Proteins for Storage. In *Cold Spring Harbor Protocols* (Vol. 2010, pp. 1–15). <http://doi.org/10.1101/pdb.top79>
- Stamm, L. V. (2010). Global challenge of antibiotic-resistant *Treponema pallidum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(2), 583–589. <http://doi.org/10.1128/AAC.01095-09>
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41, 207–234. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
- Sun, A. H., Mao, Y. F., Hu, Y., Sun, Q., & Yan, J. (2009). Sensitive and specific ELISA coated by TpN15-TpN17-TpN47 fusion protein for detection of antibodies to *Treponema pallidum*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 47(3), 321–326. <http://doi.org/10.1515/CCLM.2009.071>
- Sun, R., Lai, D. H., Ren, R. X., Lian, S., & Zhang, H. P. (2013). *Treponema pallidum*-specific antibody expression for the diagnosis of different stages of syphilis. *Chinese Medical Journal*, 126(2), 206–210. <http://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20122207>
- The World Bank. (2004). *World development report 2004: making services work for poor people*.
- Tong, Y., Feng, S., Xin, Y., Yang, H., Zhang, L., Wang, W., & Chen, W. (2016). Enhancement of soluble expression of codon-optimized *Thermomicrobium roseum* sarcosine oxidase in *Escherichia coli* via chaperone co-expression. *Journal of Biotechnology*, 218(1), 75–84.
- Tucker JD, Chen XS, P. R. (2010). Syphilis and Social Upheaval in China Retinal Injuries from a Handheld Laser Pointer, 1658–1661.
- Turnes, A. L. (2007). *La sífilis en la medicina. Una aproximación a su historia*.
- Unemo, M., Ballard, R., Ison, C., Lewis, D., Ndowa, F., & Peeling, R. (2013). *Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus*.
- Vallejo, L. F., & Rinas, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, 3(11), 1–12. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-3-11>
- Vignale, R., Amor, F., Paciel, J. (1986). *Historia, evolución y estado actual de las enfermedades de transmisión sexual en el Uruguay*.
- Weigel, L. M., Brandt, M. E., & Norgard, M. V. (1992). Analysis of the N-terminal region of the 47-kilodalton integral membrane lipoprotein of *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*, 60(4), 1568–1576.
- Welch, R. J., & Litwin, C. M. (2010). Evaluation of Two Immunoblot Assays and a Western Blot Assay for the Detection of Antisyphilis Immunoglobulin G Antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(1), 183–184. <http://doi.org/10.1128/CVI.00279-09>

- Wicher, K. (1986). Kinetics of antibody response to polypeptides of pathogenic and nonpathogenic treponemes in experimental syphilis. *Sexually Transmitted Diseases*, 13, 251–257.
- Wicher, K. (1990). Autoimmunity in syphilis. *Immunol Serol*, 52, 101–124.
- Wicher, K., Jakubowski, A., Wicher, V., & Centerfor, W. (1987). Humoral response in *Treponema pallidum*-infected guinea pigs : I . Antibody specificity. *Clin Exp Immunol*, 69, 263–270.
- World Health Organization, W. H. (2007). *THE GLOBAL ELIMINATION OF CONGENITAL SYPHILIS : RATIONALE AND STRATEGY FOR ACTION*.
- Wu, P., Chen, T., Chi, J., Chien, M., & Huang, C. (2016). Efficient expression and purification of porcine circovirus type 2 virus-like particles in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 220(1), 78–85. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.01.017>
- Xi, H., Yuan, R., Chen, X., Gu, T., Cheng, Y., Li, Z., ... Wu, Y. (2016). Purification and on-column refolding of a single-chain antibody fragment against rabies virus glycoprotein expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 5(1), 26–32. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2016.05.004>
- Yamaguchi, H., & Miyazaki, M. (2014). Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules*, 4, 235–251. <http://doi.org/10.3390/biom4010235>
- Yin, F. (2012). Spatial analysis of primary and secondary syphilis incidence in China , 2004 – 2010 PhD *, 870–875.
- Yuan, J., Zhou, H., Yang, Y., Li, W., & Wan, Y. (2014). Refolding and simultaneous purification of recombinant human proinsulin from inclusion bodies on protein-folding liquid-chromatography columns. *Biomedical Chromatography*, 29(5), 777–782. <http://doi.org/10.1002/bmc.3358>
- Zarakolu, P., Buchanan, I., Tam, M., Smith, K., & Hook, E. W. (2002). Preliminary evaluation of an immunochromatographic strip test for specific *Treponema pallidum* antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 3064–3065. <http://doi.org/10.1128/JCM.40.8.3064-3065.2002>
- Zhai, L., Wu, L., Li, F., Burnham, R. S., Pizarro, J. C., & Xu, B. (2016). A Rapid Method for Refolding Cell Surface Receptors and Ligands. *Nature Publishing Group*, 6(1), 1–9. <http://doi.org/10.1038/srep26482>
- Zhang, R.-L., Wang, Q.-Q., Zhang, J.-P., & Yang, L.-J. (2015). Tp17 membrane protein of *Treponema pallidum* activates endothelial cells in vitro. *International Immunopharmacology*, 25(2), 538–544. <http://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.02.028>