



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
Ciencias e Ingeniería

Evaluación de la inmunogenicidad celular de proteínas seleccionadas de *Treponema pallidum* mediante detección y cuantificación de IFN- γ en pacientes con sífilis en Lima, Perú

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA

AUTOR(ES)

CADY EYTABEL LOBATON FLORES

ASESOR(ES)

ISKRA TUERO OCHOA

CO-ASESOR(ES)

SILVER KEITH VARGAS RIVERA

LIMA - PERÚ
2026

Jurado calificador

Presidente: Dra. Maritza Mercedes Calderon Sanchez de Jimenez

Vocal: Dra. Katherine Jessica Torres Fajardo

Secretario: Dra. Sandra Patricia Palma Albornoz



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	LOBATON FLORES CADY EYTABEL

Pertenecientes al programa de la **CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**, autores del trabajo titulado: **Evaluación de la inmunogenicidad celular de proteínas seleccionadas de *Treponema pallidum* mediante detección y cuantificación de IFN- γ en pacientes con sífilis en Lima, Perú**, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el **TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	TUERO OCHOA ISKRA	FACI	ASESOR
2.	VARGAS RIVERA SILVER KEITH	-	CO-ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de 5%, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3608707390**; fecha de entrega: **09/07/2026**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

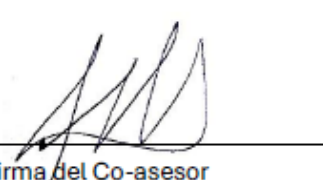
Lugar y fecha: **Lima, 09 de julio de 2026**



Firma del asesor

N° DNI: 23932342

ORCID: 0000-0002-5788-1051



Firma del Co-asesor

N° DNI: 43291317

ORCID: 0000-0002-8188-9598

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiarme en este camino, sostenerme en los momentos difíciles y ser mi fortaleza para culminar esta etapa.

A mis padres, Hilda Flores y Dalmiro Lobaton, por su amor, esfuerzo y apoyo incondicional, y por ser mi mayor motivación para seguir adelante. A mis hermanos, Jamil, Sami y Jasmin, por sus consejos y palabras de ánimo. A Jemmy, por acompañarme con amor, paciencia y comprensión. A Honey, por llenar mis días de ternura y alegría, incluso a la distancia.

A mis mentores, la Dra. Iskra Tuero y el Mgtr. Silver Vargas, por su orientación, confianza y acompañamiento académico. De manera especial, agradezco a la Dra. Iskra por su guía constante, sus enseñanzas y por brindarme la oportunidad de acercarme más a la investigación.

Finalmente, agradezco al proyecto PICASSO y a todas las personas que hicieron posible la disponibilidad de los recursos necesarios para desarrollar este estudio.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. PREGUNTA	7
III. OBJETIVOS.....	7
3.1 Objetivo general.....	7
3.2 Objetivos específicos	8
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1 Tipo y diseño de estudio	8
4.2 Población y muestra.....	8
4.3 Operacionalización de variables	11
4.4 Selección de proteínas recombinantes de <i>T. pallidum</i>	11
4.5 Procedimiento experimental	13
4.6 Ensayo ELISpot	14
4.7 Análisis estadístico	18
4.8 Consideraciones éticas y de bioseguridad	18
V. RESULTADOS.....	20
5.1 Participantes.....	20
5.2 Respuesta de IFN- γ frente a antígenos recombinantes de <i>T. pallidum</i>	22
5.3 Frecuencia de respondedores de IFN- γ frente al sonicado de <i>T. pallidum</i> (TpS) y a antígenos recombinantes	23
5.4 Comparación de la magnitud de la respuesta de IFN- γ entre reinfección e infección <i>de novo</i>	25
5.5 Correlación de la respuesta de IFN- γ frente a antígenos recombinantes de <i>T.</i> <i>pallidum</i>	27
VI. DISCUSIÓN.....	29
VII. CONCLUSIONES.....	33
VIII. LIMITACIONES	34
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXOS	43

ABREVIATURAS

AEC: 3-amino-9-etilcarbazol (del inglés, *3-amino-9-ethylcarbazole*)

BSA: Albúmina sérica bovina (del inglés, *bovine serum albumin*)

CD4: Linfocitos T CD4⁺

ELISpot: Ensayo de inmunospot ligado a enzimas (del inglés, *enzyme-linked immunospot*)

FBS: Suero fetal bovino (del inglés, *fetal bovine serum*)

FTA-ABS: Prueba de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (del inglés, *fluorescent treponemal antibody absorption*)

HRP: Peroxidasa de rábano picante (del inglés, *horseradish peroxidase*)

HSH: Hombres que tienen sexo con hombres

IFN- γ : Interferón gamma

MT: Mujeres trans

OMS: Organización Mundial de la Salud

OMPs: Proteínas de membrana externa (del inglés, *outer membrane proteins*)

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica (del inglés, *peripheral blood mononuclear cells*)

PBS: Solución salina tamponada con fosfato (del inglés, *phosphate-buffered saline*)

PHA: Fitohemaglutinina (del inglés, *phytohemagglutinin*)

PVDF: Fluoruro de polivinilideno (del inglés, *polyvinylidene fluoride*)

RPR: Prueba rápida de reagina plasmática (del inglés, *rapid plasma reagin*)

SFC: Células formadoras de spots (del inglés, *spot-forming cells*)

TPPA: Ensayo de aglutinación de partículas de *Treponema pallidum* (del inglés, *Treponema pallidum particle agglutination*)

TpS: Sonicado de *Treponema pallidum*

VDRL: Prueba del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Venéreas (del inglés, *Venereal Disease Research Laboratory*)

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

RESUMEN

Introducción: La sífilis, causada por *Treponema pallidum*, sigue siendo un grave problema de salud pública en el Perú, afectando especialmente a poblaciones clave como hombres que tienen sexo con hombres (HSH), mujeres trans (MT) y trabajadoras sexuales. No existe una vacuna eficaz, y persiste una brecha en la identificación y priorización de antígenos de *T. pallidum* con evidencia funcional en humanos. Si bien la respuesta inmune celular, particularmente la respuesta tipo Th1 asociada a la producción de interferón gamma (IFN- γ), es fundamental para el control de la infección, aún se conoce poco sobre la capacidad de distintos antígenos para inducirla. Esta falta de información dificulta comprender la inmunidad frente a la infección e identificar antígenos candidatos para estrategias preventivas y diagnósticas. **Objetivo:** Evaluar la inmunogenicidad celular de 11 proteínas recombinantes seleccionadas de *T. pallidum* mediante la detección y cuantificación de IFN- γ por ELISpot en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con sífilis. **Metodología:** Estudio transversal comparativo con enfoque experimental *in vitro*. Se trabajó con PBMCs criopreservadas de 27 participantes con sífilis activa (12 infección *de novo*; 15 reinfección) y 13 seronegativos. Las células se estimularon con 11 antígenos recombinantes, sonicado de *T. pallidum* (TpS) y controles específicos. **Resultados:** En sífilis activa, las 11 proteínas recombinantes indujeron producción detectable de IFN- γ . La respuesta fue heterogénea entre individuos y mostró diferencias globales entre antígenos (Friedman = 29.82; $p = 0.0009$). El 66.67% (18/27) respondió a TpS. Entre estos, Tp0163 presentó la mayor frecuencia de respuesta (77.78%), seguida de Tp0435 y Tp0621 (72.22% cada uno). La magnitud de respuesta de IFN- γ frente a Tp0621 ($p = 0.0239$) y Tp0954 ($p = 0.0216$) fue mayor en el subgrupo de reinfección que en el de infección *de novo*. **Conclusión:** Los hallazgos muestran una inmunogenicidad celular diferencial entre antígenos y una jerarquía de reconocimiento compatible con inmunodominancia antigénica. En los respondedores a TpS, la reinfección se asoció con una mayor producción de IFN- γ frente a Tp0621 y Tp0954, lo que podría reflejar una respuesta de memoria inmunológica asociada a la reexposición. El estudio aporta evidencia útil para priorizar antígenos candidatos con potencial aplicación inmunodiagnóstica y vacunal.

Palabras clave: Sífilis, *Treponema pallidum*, inmunidad celular, interferón gamma, ELISPOT

ABSTRACT

Introduction: Syphilis, caused by *Treponema pallidum*, remains a major public health problem in Peru, especially among key populations such as men who have sex with men (MSM), transgender women (TW), and female sex workers. No effective vaccine is currently available, and evidence supporting the identification and prioritization of *T. pallidum* antigens with functional relevance in humans remains limited. Although cellular immunity, particularly Th1-type responses associated with interferon-gamma (IFN- γ) production, is essential for infection control, little is known about which *T. pallidum* antigens can induce this response. This lack of information limits the understanding of immunity against infection and the identification of candidate antigens for preventive and diagnostic strategies. **Objective:** To evaluate the cellular immunogenicity of 11 selected recombinant *T. pallidum* proteins by detecting and quantifying IFN- γ using ELISpot in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with syphilis. **Methodology:** A comparative cross-sectional study with an *in vitro* experimental approach was conducted. Cryopreserved PBMCs from 27 participants with active syphilis (12 *de novo* infection; 15 reinfection) and 13 seronegative participants were used. The cells were stimulated with 11 recombinant antigens, *T. pallidum* sonicate (TpS), and specific controls. **Results:** In active syphilis, the 11 recombinant proteins induced detectable IFN- γ production. The response was heterogeneous among individuals and showed overall differences among antigens (Friedman = 29.82; $p = 0.0009$). A total of 66.67% (18/27) responded to TpS. Among these, Tp0163 showed the highest response frequency (77.78%), followed by Tp0435 and Tp0621 (72.22% each). The magnitude of the IFN- γ response to Tp0621 ($p = 0.0239$) and Tp0954 ($p = 0.0216$) was higher in the reinfection subgroup than in the *de novo* infection subgroup. **Conclusion:** These findings show differential cellular immunogenicity among antigens and a hierarchy of recognition compatible with antigenic immunodominance. Among TpS responders, reinfection was associated with higher IFN- γ production in response to Tp0621 and Tp0954, which may reflect an immune memory response related to re-exposure. This study provides useful evidence to prioritize candidate antigens with potential immunodiagnostic and vaccine applications.

Keywords: Syphilis, *Treponema pallidum*, cellular immunity, interferon gamma, ELISPOT

I. INTRODUCCIÓN

La sífilis es una infección bacteriana de transmisión sexual y vertical, causada por *Treponema pallidum subsp. pallidum* (*T. pallidum*), que, a pesar de ser prevenible, diagnosticable y tratable, continúa siendo un importante problema de salud pública a nivel mundial (1). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2022 se estimaron cerca de 8 millones de nuevos casos en todo el mundo, incluyendo aproximadamente 700 000 casos de sífilis congénita, cifra muy superior al umbral establecido por la OMS para su eliminación (2,3).

En la región de las Américas, la sífilis persiste como una enfermedad endémica, con 3,37 millones de nuevas infecciones en 2022, especialmente en países de ingresos bajos y medianos, donde el acceso a los servicios de salud, diagnóstico y tratamiento ha dificultado su control (2–4). Esta elevada carga de enfermedad se concentra en poblaciones vulnerables como los hombres que tienen sexo con hombres (HSH), las mujeres trans (MT) y las personas que ejercen el trabajo sexual, quienes presentan tasas elevadas de infección y coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (5,6). La sífilis puede manifestarse de forma asintomática en personas con VIH y en aquellas sin VIH que tienen antecedentes de infección previa (7,8). En HSH coinfectados con VIH, las reinfecciones por sífilis son particularmente frecuentes, con incidencias que alcanzan hasta el 29%, en comparación con el 16% en aquellos sin infección por VIH (9).

En Perú, esta situación es particularmente crítica, con la ciudad de Lima concentrando el 70% de los casos de sífilis activa del país (10). Se observa una elevada prevalencia de sífilis reciente y coinfección con VIH en poblaciones clave, como HSH y MT (11,12), además de un preocupante aumento de la sífilis congénita en los últimos años (13). Factores socioestructurales como el estigma, la falta de educación sexual y las desigualdades en el acceso a los servicios de salud agravan esta situación, lo que evidencia la necesidad de fortalecer las estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento en contextos de alta vulnerabilidad (14–16).

Clínicamente, la sífilis es una infección de múltiples etapas, de curso variable, que puede manifestarse en cuatro fases bien caracterizadas: primaria, secundaria, latente y terciaria (1). En la etapa primaria, se presenta típicamente una úlcera indolora (chancro) en el sitio de inoculación; en la secundaria, se observa una diseminación sistémica con manifestaciones cutáneas y ganglionares. Sin tratamiento, la infección puede evolucionar hacia una fase latente, clínicamente silenciosa, que puede persistir durante años y, en algunos casos, progresar a una etapa terciaria, caracterizada por complicaciones graves y crónicas como neurosífilis, cardiosífilis o goma sífilítica (1,17–19). Su presentación clínica puede ser atípica o incluso asintomática, especialmente en casos de reinfecciones o coinfección con VIH (8,20). Esta variabilidad clínica incrementa el riesgo de transmisión vertical y de sífilis congénita en mujeres gestantes (13). Se ha descrito que la respuesta inmune del hospedero frente a *T. pallidum* varía significativamente según el estadio clínico de la infección, siendo más activa y robusta en la fase primaria, mientras que en etapas avanzadas o en reinfecciones puede volverse atenuada o disfuncional, lo que podría alterar la presentación clínica y los hallazgos serológicos (7,21,22).

Actualmente, el diagnóstico se basa en pruebas serológicas no treponémicas y treponémicas (19). Las pruebas no treponémicas, como la prueba del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Venéreas (VDRL, del inglés *Venereal Disease Research Laboratory*) o la prueba rápida de reagina plasmática (RPR, del inglés *rapid plasma reagin*), detectan anticuerpos inespecíficos generados durante la infección y son útiles para el seguimiento terapéutico. En cambio, las pruebas treponémicas, como la prueba de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-ABS, del inglés *fluorescent treponemal antibody absorption*) o el ensayo de aglutinación de partículas de *Treponema pallidum* (TPPA, del inglés *Treponema pallidum particle agglutination*), detectan anticuerpos específicos contra *T. pallidum* y permiten confirmar la infección (23,24). Ambos tipos de pruebas han sido fundamentales para el control clínico; sin embargo, presentan limitaciones para diferenciar entre una infección *de novo* (reciente), que corresponde al primer episodio en una persona sin antecedentes, y una reinfección, entendida como una nueva exposición al patógeno en un individuo previamente tratado (19,23,25). Además, las pruebas treponémicas no permiten, por sí solas,

distinguir entre una infección activa y una infección pasada o previamente tratada, debido a que los anticuerpos treponémicos pueden persistir durante años, e incluso de por vida, aun después de un tratamiento exitoso (23,24). Por ello, la interpretación de los hallazgos serológicos debe realizarse teniendo en cuenta el contexto clínico, los antecedentes de tratamiento y el historial serológico del paciente. Esto resulta importante en los casos de reinfección, en los que la memoria inmunológica previa puede modificar la respuesta del hospedero y dificultar el diagnóstico y seguimiento oportuno (25,26).

Estas limitaciones en el diagnóstico serológico muestran la necesidad de explorar nuevas herramientas inmunológicas funcionales que ayuden a caracterizar con mayor precisión la respuesta inmune del hospedero frente a *T. pallidum*.

Aunque la producción de anticuerpos es detectable desde etapas tempranas de la infección, varios estudios indican que la respuesta humoral no sería suficiente, por sí sola, para lograr un control completo del patógeno, especialmente en personas coinfectadas con VIH (27,28). En cambio, la respuesta celular mediada por linfocitos T con perfil Th1, en particular la producción de interferón gamma (IFN- γ), cumple un papel crítico en el control de la infección (29,30). El IFN- γ favorece un entorno proinflamatorio que potencia la actividad de los macrófagos y su capacidad microbicida; por ello, se considera un marcador relevante de activación inmune celular frente al patógeno (22,29,30). A pesar de ello, aún son limitados los estudios en humanos que han evaluado la producción de IFN- γ frente a proteínas antigénicas recombinantes de *T. pallidum*, particularmente en contextos clínicos diferenciados, como la infección *de novo* y la reinfección (29,31,32). En parte, esto podría explicarse por el uso todavía limitado de técnicas funcionales sensibles, como el ensayo ELISpot (del inglés *enzyme-linked immunospot*), para evaluar la respuesta celular mediada por linfocitos T. Esto dificulta la comprensión del reconocimiento antigénico frente al patógeno y sustenta la necesidad de estudiar candidatos antigénicos previamente identificados, pero poco evaluados en el contexto de la inmunidad celular (27,31,32).

Por otro lado, *T. pallidum* posee una notable capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero mediante mecanismos como la expresión limitada de proteínas de membrana externa (OMPs, del inglés *outer membrane proteins*), la

variación antigénica y el mimetismo molecular. Asimismo, aún se desconocen con exactitud las proteínas antigénicas responsables de inducir una respuesta protectora efectiva, lo que refuerza la necesidad de caracterizar las propiedades inmunológicas de antígenos actualmente en estudio e identificar aquellas capaces de inducir una respuesta celular funcional frente al patógeno (33–36). En esta línea, el trabajo de Haynes et al. (32) representa un antecedente importante para este estudio. Su enfoque fue humoral, pero permitió identificar proteínas antigénicas de *T. pallidum* con alta reactividad en sueros de pacientes con sífilis: Tp0621, Tp0117, Tp0897, Tp0769, Tp0435, Tp0574, Tp0768, Tp0163, Tp1038 y Tp0954. Esta reactividad varió según el estadio clínico y el historial de infección, por lo que estas proteínas podrían ser útiles para el diagnóstico temprano, la estadificación de la sífilis y la respuesta al tratamiento. En el contexto celular, también se ha reportado que Tp0621, Tp0769, Tp0435 y Tp0574 pueden ser reconocidas por linfocitos T CD4⁺, con evidencia de producción de IFN- γ (31). Esto las posiciona como candidatas de interés para investigaciones de inmunogenicidad celular en humanos (37,38). A esto se suma que Tp0897, Tp0117 y Tp0954 han sido propuestas en otros estudios como candidatas prometedoras para el desarrollo de vacunas contra *T. pallidum* (39–41). En conjunto, estos antecedentes respaldan la relevancia inmunológica de varias proteínas incluidas en el panel evaluado en la presente tesis y sustentan la evaluación de un conjunto diverso de proteínas recombinantes con evidencia previa de reconocimiento humoral y/o celular, así como con relevancia biológica durante la infección.

Por ello, el presente estudio evaluó la inmunogenicidad celular de 11 proteínas recombinantes de *T. pallidum* mediante la detección y cuantificación de IFN- γ . Esta citocina se empleó como marcador funcional de respuestas celulares tipo Th1. Tras la estimulación antigénica *in vitro*, este enfoque permitió identificar proteínas capaces de inducir respuestas celulares relevantes para el control de la infección.

Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*) de pacientes con sífilis, que incluyen linfocitos T circulantes capaces de responder a antígenos del patógeno. La producción de IFN- γ se evaluó mediante ELISpot, un ensayo altamente sensible

que permite detectar y cuantificar, a nivel de célula individual, células secretoras de esta citocina (42).

Las proteínas recombinantes analizadas en la presente investigación fueron previamente evaluadas en el contexto de la respuesta humoral (32), en el marco del estudio de cohorte longitudinal multicéntrico PICASSO (*Comprender las interacciones hospedero-patógeno en pacientes con infección por sífilis; SIDISI 103093*), en ejecución en Lima, Perú, orientado a caracterizar el perfil inmunológico global frente a *T. pallidum*, incluyendo componentes humorales y perfiles de citocinas séricas (25). A partir de esta evidencia, dichas proteínas fueron seleccionadas en el estudio PICASSO para una evaluación a nivel celular orientada a complementar la evidencia humoral previa. En ese sentido, la presente tesis constituye un subestudio funcional centrado en la respuesta celular asociada a la producción de IFN- γ frente a un panel de proteínas recombinantes cuya inmunogenicidad celular ha sido escasamente estudiada en humanos. Esta evaluación funcional permitirá profundizar en la comprensión de la inmunidad celular frente a *T. pallidum* y generar evidencia sobre qué antígenos recombinantes presentan mayor capacidad para inducir producción de IFN- γ . Asimismo, los hallazgos podrían contribuir a la priorización de antígenos candidatos con potencial utilidad como biomarcadores de respuesta celular y como base para futuras investigaciones diagnósticas o vacunales.

II. PREGUNTA

¿Cuáles de las 11 proteínas recombinantes seleccionadas de *T. pallidum* inducen *in vitro* producción de IFN- γ en células inmunes de pacientes con sífilis?

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la inmunogenicidad celular de proteínas recombinantes seleccionadas de *T. pallidum* en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) de pacientes con sífilis.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar y cuantificar la producción de IFN- γ en PBMCs de pacientes con sífilis tras la estimulación con 11 proteínas recombinantes de *T. pallidum*, mediante ELISpot.
- Comparar la magnitud de la respuesta de IFN- γ inducida por las proteínas recombinantes de *T. pallidum* según el historial de infección (infección *de novo* vs. reinfección).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Tipo y diseño de estudio

Estudio analítico, transversal comparativo, con enfoque experimental *in vitro*. Este trabajo corresponde a un subestudio funcional derivado del protocolo principal PICASSO (SIDISI 103093) (25), del cual proceden las muestras biológicas y las proteínas recombinantes evaluadas. El análisis de la presente tesis se basó en la estimulación *in vitro* de PBMCs con proteínas recombinantes de *T. pallidum* y la posterior evaluación de la producción de IFN- γ mediante ELISpot.

4.2 Población y muestra

4.2.1 Población de estudio

Se incluyó un subconjunto de participantes del protocolo PICASSO (25), siguiendo sus definiciones operacionales, criterios diagnósticos y de clasificación:

Grupo sífilis activa (n = 27)

Se trabajó con participantes con diagnóstico reciente de sífilis activa en estadios clínicos tempranos (sífilis primaria, secundaria y latente precoz). El diagnóstico incluyó pruebas serológicas no treponémicas (RPR reactivo) y treponémicas (TPPA positiva). Según el historial de infección, se clasificaron en dos subgrupos:

- **Infección *de novo* (reciente) (n = 12):** participantes sin antecedentes de sífilis, con prueba rápida treponémica no reactiva documentada en los últimos 12 meses y, al enrolamiento, prueba rápida treponémica reactiva, RPR reactivo y TPPA positiva; y/o presentación clínica compatible con

sífilis primaria cuando las pruebas diagnósticas iniciales resultaron no reactivas.

- **Reinfección (n = 15):** participantes con antecedente documentado de sífilis y tratamiento previo, con incremento ≥ 4 veces en el título de RPR respecto a la medición anterior que determinó cura, o con RPR recientemente reactivo y TPPA positiva.

Grupo sífilis negativa (n = 13)

Adicionalmente, el estudio PICASSO incluyó un grupo sífilis negativa, conformado por participantes sin evidencia clínica ni serológica de infección por *T. pallidum* (RPR no reactivo y prueba rápida treponémica no reactiva). Las muestras biológicas de este grupo se emplearon para estimar la reactividad basal del ensayo ELISpot y corroborar que la señal residual observada tras la corrección de fondo fue de baja magnitud.

4.2.2 Criterios de elegibilidad

a) Estudio PICASSO

Para ser incluidos en el estudio PICASSO, los participantes debieron cumplir con los siguientes criterios (25):

Criterios de inclusión

- Edad ≥ 18 años al momento del enrolamiento.
- Diagnostico reciente de sífilis activa, con clasificación clínica y serológica según los criterios del estudio.
- Compromiso de permanecer en Lima o sus alrededores durante los próximos 12 meses.
- Disposición para brindar muestras de sangre venosa.

Criterios de exclusión

- Incapacidad para otorgar consentimiento informado.
- Alta probabilidad de no completar el seguimiento requerido por el estudio.

Para el grupo sífilis negativa:

Participantes ≥ 18 años, sin antecedentes clínicos ni serológicos de sífilis.

b) Subestudio

Para el presente estudio (SIDISI 219837), se incluyeron muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) que cumplieron con los siguientes criterios técnicos:

Criterios de inclusión

- Viabilidad celular post-descongelación $\geq 80\%$; se aceptaron también muestras con viabilidad $\geq 60\%$, siempre que la funcionalidad celular se confirmara mediante una respuesta adecuada al control positivo (PHA).
- Disponibilidad de $\geq 7 \times 10^6$ PBMCs viables post-descongelación para estimular cada muestra con 11 antígenos recombinantes de *T. pallidum*, su sonicado (TpS) y los controles del ensayo, en duplicado técnico.

Criterios de exclusión

- Duplicados técnicos con coeficiente de variación (CV) $> 20\%$.
- Fallas en los controles del ensayo.

4.2.3 Muestra de estudio

Las muestras de los participantes correspondieron a PBMCs, previamente aisladas a partir de 40 mL de sangre total recolectada en la semana 0 (momento del diagnóstico), criopreservadas y almacenadas en nitrógeno líquido conforme al protocolo PICASSO. Cada vial contenía aproximadamente $12\text{--}20 \times 10^6$ células congeladas. Para este estudio, se utilizaron viales con un tiempo de almacenamiento ≤ 1 año al momento del procesamiento.

Para estimar el tamaño de muestra, se utilizó el software G*Power (versión 3.1.9.7), empleando una prueba *t* para muestras independientes y considerando la comparación de la magnitud de la respuesta de IFN- γ entre los subgrupos de infección *de novo* y reinfección. Se asumió un tamaño de efecto grande ($d = 1.0$), $\alpha = 0.05$ (bilateral) y un poder estadístico $(1-\beta) = 0.80$, obteniéndose un mínimo de 17 participantes por subgrupo. Sin embargo, por disponibilidad de muestras (muestreo por conveniencia), se incluyeron 27 participantes con sífilis activa, estratificados según historial de infección en infección *de novo* ($n = 12$) y

reinfección (n = 15). Si bien no se alcanzó el tamaño muestral estimado por subgrupo, el poder estadístico (*post hoc*) fue de 0.70; en el análisis de sensibilidad, el tamaño de efecto mínimo detectable para un poder de 0.80 fue d = 1.13. Adicionalmente, se incluyó un grupo sífilis negativa (n = 13), el cual no formó parte del cálculo de tamaño muestral.

4.3 Operacionalización de variables

Las variables de estudio se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Operacionalización de las variables de estudio

Variable	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Medición / Instrumento
Tipo de infección	Clasificación de los participantes con sífilis activa según su historial de infección: 1) Infección <i>de novo</i> , 2) Reinfección	Independiente	Cualitativa nominal	Ficha de recolección de datos del estudio PICASSO
Proteína inmunogénica	Proteína recombinante seleccionada de <i>T. pallidum</i> utilizada como estímulo antigénico para inducir la producción de IFN- γ en PBMCs (panel de 11 proteínas, cada una evaluada de manera independiente por participante)	Independiente (medida repetida)	Cualitativa nominal	Ensayo ELISpot por condición de estímulo antigénico
Producción de IFN-γ	Secreción detectada en células inmunes formadoras de spots (SFC) tras estimulación con cada proteína recombinante	Dependiente	Cuantitativa continua (de razón)	Ensayo ELISpot (conteo manual sobre imágenes digitales; SFC/10 ⁶ PBMC)

4.4 Selección de proteínas recombinantes de *T. pallidum*

Las 11 proteínas recombinantes analizadas en este estudio fueron previamente evaluadas en el contexto de la respuesta humoral frente a *T. pallidum* (32), en el marco del protocolo PICASSO (25). A partir de esta evidencia y de criterios complementarios, dicho protocolo definió y priorizó un panel de antígenos candidatos para explorar su inmunogenicidad celular.

La priorización del panel partió de la evidencia disponible sobre el potencial inmunogénico de estas proteínas. Este potencial se sustentó en su reactividad humoral en individuos con sífilis (32), en el reconocimiento por linfocitos T CD4⁺ descrito para algunas de ellas (31) y en su propuesta como candidatas vacunales (39–41). También se buscó incluir proteínas con diversidad estructural y funcional

(Tabla 2). La evidencia proteómica reciente las vincula con procesos importantes para la biología y la patogénesis de *T. pallidum*, como la adhesión, la evasión inmune, el transporte y el metabolismo bacteriano (31,39,40,43). Además, se consideró su localización subcelular propuesta en distintos compartimentos bacterianos (Figura 1), ya que esto ayuda a interpretar su posible disponibilidad antigénica para ser procesadas, presentadas y reconocidas por las células inmunes del hospedero. Con estos criterios, resultó pertinente evaluar si este panel antigénico podía inducir producción detectable de IFN- γ en PBMCs de pacientes con sífilis activa.

Tabla 2. Características principales de las proteínas recombinantes de *T. pallidum* evaluadas en este estudio

Código del gen (Tp)	Nombre común	Tipo de proteína	Función putativa / conocida
Tp0621	TprJ5'	OMP putativa	Familia Tpr; porina putativa con inmunogenicidad poco caracterizada, con posible rol en adherencia o evasión inmune
Tp1038	TpF1 (también denominado antígeno 4D)	Periplásmica putativa	Proteína tipo bacterioferritina; inmunogénica e inmunomoduladora
Tp0897	TprK5' (región conservada)	OMP putativa	Familia Tpr; porina putativa con alta variabilidad antigénica, inmunogénica e inmunodominante, asociada a evasión inmune
Tp0117	TprC	OMP putativa (posible exposición superficial parcial)	Familia Tpr; porina putativa trimérica con estructura tipo β -barril, inmunogénica
Tp0131	TprD2	OMP putativa	Familia Tpr; variante alélica de TprD, inmunogénica, con función aún por definir
Tp0574	Tp47	Lipoproteína (47 kDa)	Carboxipeptidasa putativa de unión a penicilina (PBP); inmunogénica, inmunodominante e inmunomoduladora, posiblemente asociada con la inhibición de la fagocitosis
Tp0163	TroA	Periplásmica de unión a ligando	Proteína de unión periplásmica del transportador TroABC, implicado en la captación de Zn^{2+} ; inmunogénica

Tp0769	TmpB	Lipoproteína putativa	Proteína con posible rol en interacción con el hospedero, transporte o integridad de membrana; inmunogénica
Tp0768	TmpA	Lipoproteína periplásmica	Proteína con posible función de transporte o estructural; inmunogénica
Tp0435	Tp17	Lipoproteína periplásmica (17 kDa)	Adhesina putativa; inmunogénica e inmunodominante, con posible interacción con el hospedero
Tp0954	Tp0954	Lipoproteína putativa de superficie	Adhesina putativa; inmunogénica, que media la adhesión a células del hospedero, con posible rol en evasión inmune

Nota: “Putativa” indica una función inferida por similitud de secuencia y/o predicción bioinformática, no confirmada experimentalmente en este estudio.

Fuente: Elaboración propia a partir de la literatura científica (25,31,32,37,38,40,41,44).

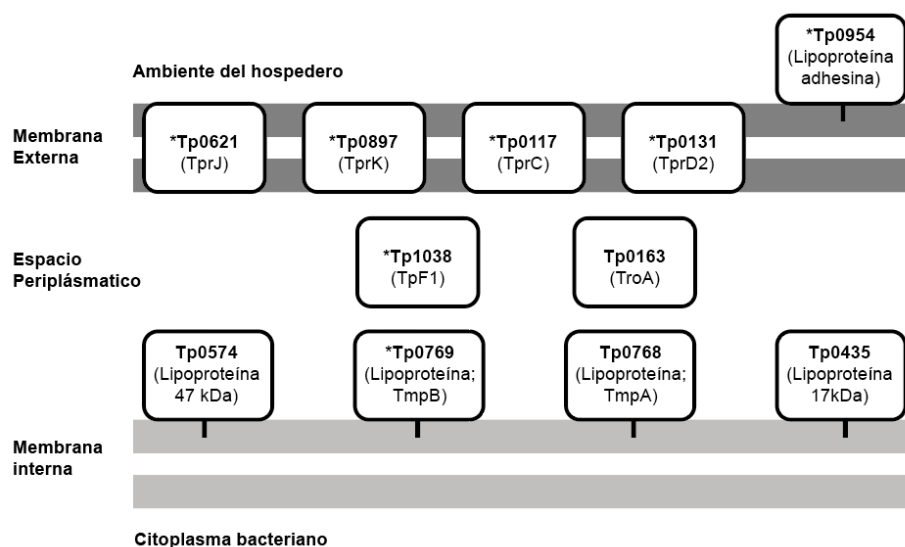


Figura 1. Localización subcelular propuesta de las proteínas recombinantes de *T. pallidum*. Esquema de la ubicación subcelular propuesta (membrana externa, espacio periplásmico y asociación con la membrana interna) de los 11 antígenos seleccionados, basado en la anotación funcional y la predicción bioinformática reportadas en la literatura. (*) indica localización putativa.

Fuente: Elaboración propia a partir de la literatura científica (25,31,32,37,38,40,41,44).

4.5 Procedimiento experimental

4.5.1 Descongelamiento de PBMCs

Las PBMCs se descongelaron rápidamente en un baño María a 37 °C. Inmediatamente después, la suspensión celular fue transferida a un tubo con medio R10 atemperado (RPMI-1640, 10% de suero fetal bovino (FBS),

100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 2 mM de L-glutamina). La mezcla fue lavada por centrifugación (1200 rpm, 7 minutos) y posteriormente resuspendida en el mismo medio. Se realizó el recuento celular y la evaluación de la viabilidad mediante exclusión con azul de tripán en cámara de Neubauer (hemocitómetro). Este método fue empleado por ser una técnica establecida para estudios con PBMCs criopreservadas dentro del protocolo PICASSO, además de ser accesible, rápida y compatible con el recuento manual de células viables tras la descongelación, previo al ensayo ELISpot (45).

4.6 Ensayo ELISpot

El ensayo ELISpot es una técnica inmunológica de alta sensibilidad y especificidad que permite detectar y cuantificar células individuales secretoras de citocinas, como el IFN- γ , en respuesta a estímulos antigénicos específicos (42). Las PBMCs de cada participante se estimularon con un panel de 11 proteínas recombinantes de *T. pallidum* (Tabla 2), evaluadas de forma individual.

4.6.1 Materiales y reactivos

Para la ejecución del ensayo ELISpot se emplearon placas de 96 pocillos con membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) (MultiScreen®, Merck, Cat. No. MAIPS4510), recubiertas con un anticuerpo monoclonal de captura anti-IFN- γ humano (anti-hIFN- γ) (clon 1-D1K, Mabtech, Cat. No. 3420-3-1000), y un anticuerpo de detección biotinilado anti-IFN- γ humano (anti-hIFN- γ -biotina) (clon 7-B6-1, Mabtech, Cat. No. 3420-6-250). Como conjugado enzimático, se utilizó NeutrAvidin-HRP (peroxidasa de rábano picante; Invitrogen, Cat. No. 31001) y, como sustrato cromogénico, AEC (3-amino-9-etilcarbazol; Merck, Cat. No. AEC101).

Además, se utilizaron los siguientes reactivos: etanol al 70%; PBS 1X estéril libre de Ca^{2+}/Mg^{2+} , pH 7.2 (solución salina tamponada con fosfato; Invitrogen); medio de cultivo completo R10 (RPMI-1640 (Gibco), 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 2 mM de L-glutamina); PBS-Tween 20 al 0.05%; y PBS-BSA al 0.5% (albúmina sérica bovina).

Como control positivo mitogénico se empleó PHA (fitohemaglutinina; Invitrogen, Cat. No. 00-4977-93). Asimismo, como estímulos antigénicos (proporcionados por PICASSO), se utilizaron: TpS (sonicado de *Treponema pallidum*; cepa Nichols; stock: 10^9 Tp/mL) como antígeno poliantigénico; y un panel de 11 proteínas recombinantes de *T. pallidum* a las siguientes concentraciones stock: Tp0621 (161.9 μ g/mL), Tp1038 (600.1 μ g/mL), Tp0897 (355.4 μ g/mL), Tp0117 (348.4 μ g/mL), Tp0131 (346.4 μ g/mL), Tp0574 (819.1 μ g/mL), Tp0163 (42.2 μ g/mL), Tp0769 (58.7 μ g/mL), Tp0768 (5718 μ g/mL), Tp0435 (293 μ g/mL) y Tp0954 (122.8 μ g/mL).

4.6.2 Procedimiento experimental del ELISpot

El ensayo ELISpot para IFN- γ se realizó tomando como base el protocolo publicado por Reid et al. (31) para estudios con proteínas de *T. pallidum*. En el Laboratorio de Inmunobiología de Infecciones–LID y en el marco del estudio PICASSO, antes del desarrollo de la presente tesis, se estandarizaron las condiciones del anticuerpo de captura anti-hIFN- γ y del anticuerpo de detección anti-hIFN- γ –biotina, así como el número de PBMCs sembradas por pocillo, las condiciones de bloqueo y lavado, los tiempos de incubación y los parámetros del revelado cromogénico. El presente estudio siguió este protocolo previamente estandarizado para la evaluación de muestras de pacientes con sífilis.

a. Día 1: Activación de membrana y recubrimiento de placas con anticuerpo de captura anti-hIFN- γ

Las membranas de PVDF de las placas se activaron mediante la adición de 40 μ L de etanol al 70% por pocillo durante 1 minuto, seguido de tres lavados consecutivos con 200 μ L de PBS 1X estéril. Posteriormente, se recubrió cada pocillo con 50 μ L (200 ng/pocillo; 4 μ g/mL) de la solución del anticuerpo de captura anti-hIFN- γ , diluida en PBS 1X estéril. Las placas se incubaron a 4 °C durante toda la noche en condiciones húmedas y estériles.

b. Día 2: Bloqueo, siembra celular y estimulación antigénica

Tras la incubación nocturna, se retiró el anticuerpo de captura y las placas se lavaron tres veces con 200 μ L de PBS 1X estéril por pocillo. Luego, se añadió 150 μ L de medio R10 como solución de bloqueo en cada pocillo y se incubó a 37 °C durante 2 horas para saturar sitios de unión no específicos y reducir

el fondo. A continuación, las PBMCs recuperadas se resuspendieron en medio R10 a una densidad de 2×10^6 células/mL. Finalizado el bloqueo, se retiró el medio y se sembraron 100 μ L de la suspensión celular por pocillo, equivalente a 2×10^5 células/pocillo. Las muestras de PBMCs de los participantes, los estímulos antigénicos y los controles se distribuyeron según un diseño de placa predefinido, manteniendo duplicados técnicos por condición, controles de estimulación por participante y controles cromogénicos por placa, utilizando una distribución estándar de placa para todas las muestras (Anexo 1). Seguidamente, se añadieron los estímulos antigénicos y los controles correspondientes según la condición experimental, como se detalla a continuación:

- **Antígeno recombinante de *T. pallidum*:** 10 μ L/pocillo (10 ng/pocillo; 0.1 μ g/mL) (31).
- **Sonicado de *T. pallidum* (TpS):** 10 μ L/pocillo (10^8 Tp/mL; 10^7 Tp/pocillo) a partir de un stock de 10^9 Tp/mL (31).
- **Control positivo (PHA):** 2 μ L/pocillo (0.5X/pocillo) a partir de un stock de 500X.
- **Control negativo:** células en medio R10 sin antígeno.
- **Controles de fondo cromogénico (sin células; con medio R10):** se incluyeron cuatro condiciones en pocillos designados: (1) medio solo; (2) sin anticuerpo de captura; (3) sin anticuerpo de detección; y (4) sin conjugado enzimático.

Luego, las placas se incubaron a 37 °C (5% CO₂, 95% de humedad), durante 24 horas.

c. Día 3: Adición del anticuerpo de detección anti-hIFN- γ -biotina, incubación con conjugado enzimático y revelado cromogénico

Al término de la incubación, se retiró la suspensión celular y las placas fueron lavadas cinco veces con 150 μ L de PBS-Tween 20 al 0.05% por pocillo, seguidas de cuatro lavados con 200 μ L de PBS 1X estéril. Posteriormente, se añadió a cada pocillo 100 μ L (50 ng/pocillo; 0.5 μ g/mL) de la solución del anticuerpo de detección anti-hIFN- γ -biotina, diluida en PBS-BSA al 0.5%. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 horas y 30 minutos. Tras este

periodo, se retiró el anticuerpo de detección y las placas se lavaron bajo el mismo esquema descrito previamente. Luego, se añadió a cada pocillo 100 μ L (250 ng/pocillo; 2.5 μ g/mL) de la solución del conjugado enzimático NeutrAvidin-HRP, diluida en PBS 1X estéril. Las placas se incubaron a temperatura ambiente, protegidas de la luz, durante 45 minutos. Posteriormente, se retiró el conjugado y las placas se lavaron nuevamente siguiendo el esquema descrito. Se añadió a cada pocillo 80 μ L de la solución del sustrato cromogénico AEC y las placas se incubaron en la oscuridad durante 1 minuto y 30 segundos. Se monitoreó el desarrollo progresivo de los puntos (spots) hasta lograr una coloración nítida, y la reacción se detuvo con agua de grifo, enjuagando a fondo una vez alcanzada la intensidad adecuada. Finalmente, las placas se dejaron secar durante toda la noche, protegidas de la luz.

4.6.2.1 Lectura e interpretación de resultados

La cuantificación de la respuesta inmunológica se realizó mediante el conteo manual de los puntos (spots) sobre imágenes digitales de cada pocillo, capturadas con el software ImmunoSpot® (ImmunoCapture 6.4) del equipo lector ELISpot, considerando cada spot como una célula mononuclear secretora de IFN- γ . Los resultados se expresaron como el número de células formadoras de spots por millón de PBMCs sembradas (SFC/10⁶ PBMC), ajustando el valor según el número de células sembradas en cada pocillo.

La corrección de fondo se realizó a nivel de cada participante, restando de la respuesta observada frente a cada antígeno de *T. pallidum* el valor obtenido en el control negativo (células en medio R10 sin antígeno) correspondiente al mismo participante, para obtener valores netos.

Para todas las muestras, se establecieron criterios de validación del ensayo, definidos como: control negativo (solo medio) < 50 SFC/10⁶ PBMC y control positivo (PHA) > 50 SFC/10⁶ PBMC (42).

4.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 10 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Dado que los datos no siguieron una distribución normal, se emplearon pruebas no paramétricas. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

Dentro del grupo con sífilis activa ($n = 27$), las diferencias globales en la magnitud de la respuesta de IFN- γ entre los 11 antígenos recombinantes se evaluaron mediante la prueba de Friedman. Para comparar la magnitud de la respuesta entre los subgrupos independientes (reinfección vs. infección *de novo*) se utilizó la prueba U de Mann–Whitney (dos colas), y para evaluar los patrones de asociación entre las respuestas frente a los distintos antígenos recombinantes se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman (r). Estos dos últimos análisis se restringieron a los participantes con sífilis activa respondedores a TpS ($n = 18$), definidos como aquellos con producción neta de IFN- $\gamma > 0$ SFC/ 10^6 PBMC frente a TpS. Esta restricción se aplicó para evitar la inclusión de valores nulos estructurales que no reflejan la magnitud de la respuesta inducida por los antígenos evaluados.

4.8 Consideraciones éticas y de bioseguridad

El presente estudio fue sometido a evaluación por el Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) y se ejecutó una vez obtenida su aprobación. Este estudio se basó en el uso de muestras y datos clínicos previamente recolectados en el marco del proyecto PICASSO, aprobado por los comités de ética de la UPCH y de la Universidad del Sur de California (USC), con número de registro SIDISI 103093. Dichas muestras y datos se encontraron anonimizados y fueron manejados mediante códigos, sin acceso a información personal identificable de los participantes. El acceso a la información estuvo restringido únicamente a los investigadores del proyecto, garantizando la confidencialidad y el uso de los datos solo para los fines establecidos en el presente estudio.

4.8.1 Manejo de muestras biológicas

Las PBMCs utilizadas en el estudio fueron muestras humanas criopreservadas; por ello, se manipularon como material potencialmente infeccioso, considerando

la posible presencia de coinfecciones por virus clasificados en el Grupo de Riesgo 2, como el VIH, el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C, de acuerdo con criterios internacionales de bioseguridad.

4.8.2 Nivel de bioseguridad del laboratorio

Los procedimientos descritos en el protocolo se realizaron en el Laboratorio de Inmunobiología de Infecciones, perteneciente a los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Facultad de Ciencias e Ingeniería (FACI) de la UPCH, el cual cuenta con nivel de bioseguridad 2 (BSL-2).

4.8.3 Equipo de Protección Personal (EPP)

Durante los procedimientos descritos en el protocolo se utilizó EPP acorde con BSL-2 y con la evaluación de riesgos asociada al manejo de muestras humanas. El EPP incluyó mandil reutilizable, guantes de nitrilo (doble guante en manipulación directa), respirador KN95 y protector facial ante riesgo de salpicaduras. La manipulación de PBMCs se realizó únicamente en cabina de bioseguridad clase II.

4.8.4 Métodos de descontaminación

Las superficies de trabajo y los materiales de uso frecuente se descontaminaron antes y después de cada procedimiento mediante la aplicación de etanol al 70%. Adicionalmente, las muestras biológicas y los residuos líquidos potencialmente contaminados se inactivaron con hipoclorito de sodio al 0.5%, con un tiempo mínimo de exposición de 30 minutos, previo a su eliminación conforme a la normativa institucional vigente.

4.8.5 Manejo y eliminación de residuos peligrosos

Los residuos peligrosos generados durante el estudio se segregaron y eliminaron conforme a la normativa vigente de la UPCH. Los residuos sólidos biocontaminados se acondicionaron y descartaron en bolsas de color rojo, colocadas en tachos con tapa accionada por pedal. Los residuos especiales, cuando correspondió, se dispusieron en bolsas de color amarillo. Los residuos punzocortantes se eliminaron en contenedores rígidos, resistentes a perforaciones, debidamente rotulados y respetando el límite máximo de llenado.

La eliminación final de los residuos se realizó a través del sistema institucional autorizado para la gestión de residuos peligrosos.

4.8.6 Almacenamiento de muestras

Las muestras biológicas utilizadas en el estudio se encontraban preservadas en el sistema de almacenamiento criogénico de nitrógeno líquido del Laboratorio de Inmunobiología de Infecciones–LID. Su manipulación se realizó conforme a las normas de bioseguridad establecidas, empleando el EPP adecuado, que incluyó guantes criogénicos, mandil de laboratorio y protector facial.

V. RESULTADOS

5.1 Participantes

Se incluyeron 40 participantes: 27 con sífilis activa, distribuidos en los subgrupos de reinfección ($n = 15$) e infección *de novo* ($n = 12$), y 13 con sífilis negativa (Tabla 3; Anexo 2). Las características demográficas mostraron un predominio de HSH en reinfección, infección *de novo* y sífilis negativa (86.67%, 100.00% y 69.23%, respectivamente), seguido de MT (13.33%, 0.00% y 23.08%, respectivamente) y, en menor proporción, hombres (7.69%, registrado únicamente en el grupo sífilis negativa). En cuanto a la distribución por edad, el rango de 30–39 años fue el más frecuente en reinfección (40.00%) e infección *de novo* (50.00%), mientras que en el grupo sífilis negativa predominó el rango de 18–29 años (38.46%).

Respecto a las características clínicas, la mediana de los títulos de RPR en los participantes con sífilis activa fue de 1:32, con rangos de 1:2–1:64 en reinfección y de 1:2–1:128 en infección *de novo*. En el subgrupo de reinfección, la mediana de episodios previos documentados fue de 2 (rango: 1–5). En cuanto al estadio clínico de los participantes con sífilis activa, predominó la sífilis latente precoz en ambos subgrupos (66.67% en reinfección y 83.33% en infección *de novo*), seguida de sífilis secundaria (20.00% y 8.33%, respectivamente) y sífilis primaria (13.33% y 8.33%, respectivamente).

La coinfección con VIH fue más frecuente en el grupo sífilis activa (70.37%, 19/27) que en el grupo sífilis negativa (53.85%, 7/13). Dentro del grupo sífilis activa, la prevalencia de VIH fue mayor en reinfección (86.67%, 13/15) que en infección *de novo* (50.00%, 6/12). Entre los participantes VIH positivos, la proporción con carga

viral suprimida (< 200 copias/mL) fue de 76.92% (10/13), 66.67% (4/6) y 57.14% (4/7) en reinfección, infección *de novo* y sífilis negativa, respectivamente. Asimismo, la proporción con recuento de linfocitos T CD4⁺ ≥ 350 células/μL fue de 69.23% (9/13), 66.67% (4/6) y 42.86% (3/7), respectivamente.

La información individual de los participantes se presenta de manera desagregada en el Anexo 2.

Tabla 3. Características demográficas y clínicas de los participantes del estudio, según grupos analizados (n = 40)

Característica	Grupos analizados		
	Sífilis activa (n = 27)		Sífilis negativa (n = 13) n (%)
	Reinfección (n = 15) n (%)	Infección <i>de novo</i> (n = 12) n (%)	
Características demográficas			
Grupo poblacional			
HSH	13 (86.67)	12 (100.00)	9 (69.23)
MT	2 (13.33)	0 (0.00)	3 (23.08)
Hombre	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (7.69)
Edad (años)			
18-29	4 (26.67)	5 (41.67)	5 (38.46)
30-39	6 (40.00)	6 (50.00)	4 (30.77)
≥ 40	5 (33.33)	1 (8.33)	4 (30.77)
Características clínicas			
Título RPR, mediana (rango) ^a	1:32 (1:2–1:64)	1:32 (1:2–1:128)	NA
Antecedentes de sífilis			
Con infección previa documentada	15 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
Sin infección previa	0 (0.00)	12 (100.00)	0 (0.00)
Sin evidencia clínica ni serológica de sífilis	0 (0.00)	0 (0.00)	13 (100.00)
Episodios previos de sífilis, mediana (rango) ^a	2 (1–5)	0 (0–0)	NA
Estadio clínico de la sífilis			
Sífilis primaria	2 (13.33)	1 (8.33)	0 (0.00)
Sífilis secundaria	3 (20.00)	1 (8.33)	0 (0.00)
Sífilis latente precoz	10 (66.67)	10 (83.33)	0 (0.00)
Sin evidencia clínica ni serológica de sífilis	0 (0.00)	0 (0.00)	13 (100.00)
Estado serológico para VIH			
VIH positivo	13 (86.67)	6 (50.00)	7 (53.85)
VIH negativo	0 (0.00)	6 (50.00)	6 (46.15)

Prueba de VIH no realizada	2 (13.33)	0 (0.00)	0 (0.00)
Entre participantes VIH positivos ^b			
Carga viral de VIH < 200 copias/mL, n/N (%)	10/13 (76.92)	4/6 (66.67)	4/7 (57.14)
Recuento de CD4 ≥ 350 células/μL, n/N (%)	9/13 (69.23)	4/6 (66.67)	3/7 (42.86)

Abreviaturas: CD4, linfocitos T CD4⁺; HSH, hombres que tienen sexo con hombres; MT, mujeres trans; NA, no aplicable; RPR, prueba rápida de reagina plasmática; VIH, virus de la inmunodeficiencia humana.

^aNo aplicable en el grupo sífilis negativa.

^bn/N (%) calculado únicamente para participantes VIH positivos.

5.2 Respuesta de IFN-γ frente a antígenos recombinantes de *T. pallidum*

La producción neta de IFN-γ por PBMCs estimuladas con 11 antígenos recombinantes de *T. pallidum*, así como con el sonicado de *T. pallidum* (TpS) y el control mitogénico positivo PHA, se cuantificó mediante ELISpot en los grupos sífilis activa (n = 27; reinfección e infección *de novo*) y sífilis negativa (n = 13) (Figura 2).

En el grupo sífilis activa se observaron respuestas detectables de IFN-γ frente a los 11 antígenos recombinantes de *T. pallidum*, con una marcada heterogeneidad interindividual en la magnitud de la respuesta (Figura 2A). En particular, algunos antígenos concentraron respuestas de mayor magnitud en un subconjunto de participantes, como Tp0435 (15/27), Tp0768 (12/27) y Tp0621 (14/27). En contraste, en el grupo sífilis negativa, la producción neta de IFN-γ fue baja en general frente a los 11 antígenos recombinantes y a TpS, con valores cercanos a cero para la mayoría de los participantes y antígenos (Figura 2B).

Considerando la heterogeneidad observada entre antígenos, se comparó la producción neta de IFN-γ inducida por los 11 antígenos recombinantes en el grupo con sífilis activa (n = 27) mediante la prueba de Friedman. Este análisis mostró diferencias globales estadísticamente significativas entre los antígenos evaluados (estadístico de Friedman = 29.82; $p = 0.0009$). El estímulo con PHA indujo respuestas robustas en ambos grupos (Figuras 2A y 2B), lo que respalda la funcionalidad de las PBMCs analizadas. Los perfiles individuales de respuesta por participante, incluida la respuesta a PHA, se presentan en los Anexos 3–5 para cada grupo.

En el Anexo 6 se incluyen imágenes representativas de pocillos del ELISpot para ilustrar el contraste señal–fondo del ensayo.

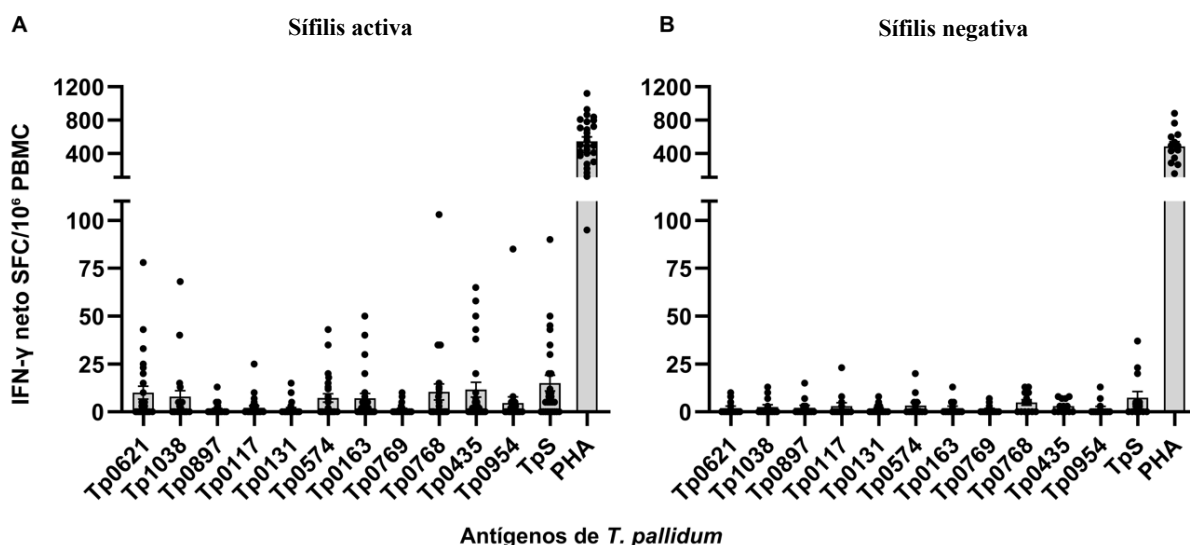


Figura 2. Producción neta de IFN- γ inducida por antígenos recombinantes de *T. pallidum* en los grupos con sífilis activa y sífilis negativa. IFN- γ medido por ELISpot en PBMCs estimuladas con 11 antígenos recombinantes, así como con TpS y PHA. (A) Grupo sífilis activa (n = 27; reinfección e infección *de novo*). (B) Grupo sífilis negativa (n = 13). Los resultados se expresan como SFC/10⁶ PBMC y corresponden a valores netos tras la corrección de fondo. Cada punto representa un participante individual; las barras indican la media $\pm$ SEM. Abreviaturas: IFN- γ , interferón gamma; PBMCs, células mononucleares de sangre periférica; PHA, fitohemaglutinina; SEM, error estándar de la media; SFC, células formadoras de spots; TpS, sonificado de *T. pallidum*.

5.3 Frecuencia de respondedores de IFN- γ frente al sonicado de *T. pallidum* (TpS) y a antígenos recombinantes

Tras evidenciar la capacidad de los 11 antígenos recombinantes de *T. pallidum* para inducir producción detectable de IFN- γ , y dado que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos sífilis activa (n = 27) y sífilis negativa (n = 13) (Anexo 7), se identificó dentro del grupo sífilis activa a los participantes respondedores al estímulo poliantigénico TpS. De los 27 participantes con sífilis activa, 18 (66.67%) presentaron respuestas detectables de IFN- γ frente a TpS (Tabla 4). Al estratificar esta respuesta según el historial de infección, se observó que 11 de 15 (73.33%) del subgrupo de reinfección y 7 de 12 (58.33%) del subgrupo de infección *de novo* respondieron a TpS.

Tabla 4. Frecuencia de respondedores de IFN- γ frente a TpS en participantes con sífilis activa (n = 27)

Subgrupo	Total (n)	Respondedores a TpS, n (%)	No respondedores a TpS, n (%)
Reinfección	15	11 (73.33)	4 (26.67)
Infección <i>de novo</i>	12	7 (58.33)	5 (41.67)

Total sífilis activa	27	18 (66.67)	9 (33.33)
-----------------------------	-----------	-------------------	------------------

Nota: Se definió como respondedor a todo participante que presentó una producción neta de IFN- γ > 0 SFC/10⁶ PBMC frente a TpS, tras la corrección de fondo. Los valores se expresan como número de respondedores (n) y porcentaje (%) respecto al total de participantes evaluados en cada subgrupo.

En adelante, los análisis se restringieron a los participantes con sífilis activa respondedores a TpS (n = 18/27), con el fin de centrar la evaluación en aquellos con evidencia de una respuesta celular treponémica global detectable. En estos respondedores a TpS, la frecuencia de respuesta detectable de IFN- γ (> 0 SFC/10⁶ PBMC) frente a los 11 antígenos recombinantes de *T. pallidum* varió según la proteína evaluada (Tabla 5), alcanzando hasta 77.78% (14/18). Las mayores frecuencias de respuesta se registraron frente a Tp0163 (77.78%, 14/18), seguidas por Tp0435 y Tp0621 (72.22%, 13/18 cada uno), y por Tp1038, Tp0574 y Tp0768 (61.11%, 11/18 cada uno). En contraste, las menores frecuencias correspondieron a Tp0897 (33.33%, 6/18) y Tp0131 (27.78%, 5/18). La distribución individual de la producción neta de IFN- γ frente a Tp0163, Tp0435 y Tp0621 se presenta en el Anexo 8.

Tabla 5. Frecuencia de respondedores de IFN- γ frente a antígenos recombinantes de *T. pallidum* en participantes con sífilis activa respondedores a TpS (n = 18)

Antígenos de <i>T. pallidum</i>	Respondedores, n (%)
Tp0163	14 (77.78)
Tp0435	13 (72.22)
Tp0621	13 (72.22)
Tp1038	11 (61.11)
Tp0574	11 (61.11)
Tp0768	11 (61.11)
Tp0954	9 (50.00)
Tp0117	7 (38.89)
Tp0769	7 (38.89)
Tp0897	6 (33.33)
Tp0131	5 (27.78)

Nota: Se definió como respondedor a todo participante que presentó una producción neta de IFN- γ > 0 SFC/10⁶ PBMC frente a cada antígeno recombinante, tras la corrección de fondo. Los valores se expresan como número de respondedores (n) y porcentaje (%) respecto al total de participantes evaluados (n = 18).

En los respondedores a TpS (n = 18), la producción neta de IFN- γ frente a los 11 antígenos recombinantes mostró una amplia variabilidad interindividual, mientras que TpS y PHA presentaron los valores netos más elevados (Figura 3).

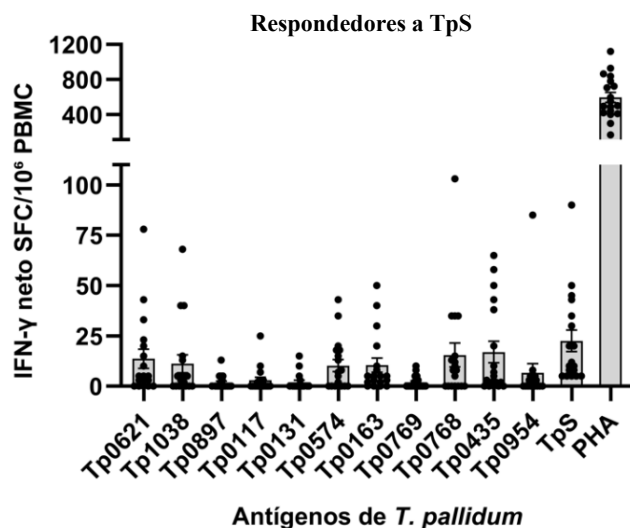


Figura 3. Producción neta de IFN- γ inducida por antígenos recombinantes de *T. pallidum* en respondedores a TpS. IFN- γ medido por ELISpot en PBMCs de participantes con sífilis activa respondedores a TpS ($n = 18$). Se muestran las respuestas frente a 11 antígenos recombinantes, así como con TpS y PHA. Los resultados se expresan como SFC/ 10^6 PBMC y corresponden a valores netos tras la corrección de fondo. Cada punto representa un participante individual; las barras indican la media $\pm$ SEM. Abreviaturas: IFN- γ , interferón gamma; PBMCs, células mononucleares de sangre periférica; PHA, fitohemaglutinina; SEM, error estándar de la media; SFC, células formadoras de spots; TpS, sonicado de *T. pallidum*.

5.4 Comparación de la magnitud de la respuesta de IFN- γ entre reinfección e infección *de novo*

Posteriormente, en los respondedores a TpS ($n = 18$) se comparó la producción neta de IFN- γ frente a los 11 antígenos recombinantes de *T. pallidum* y a TpS entre los subgrupos de reinfección ($n = 11$; Figura 4A) e infección *de novo* ($n = 7$; Figura 4B). Se observó una mayor dispersión en la magnitud de respuesta en el subgrupo de reinfección.

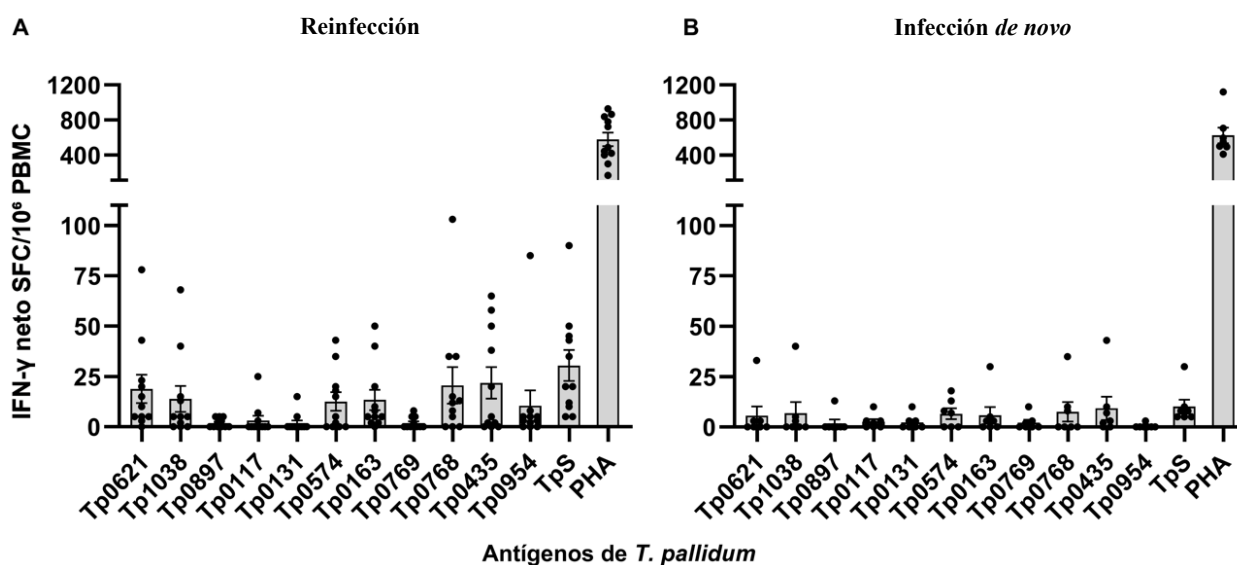
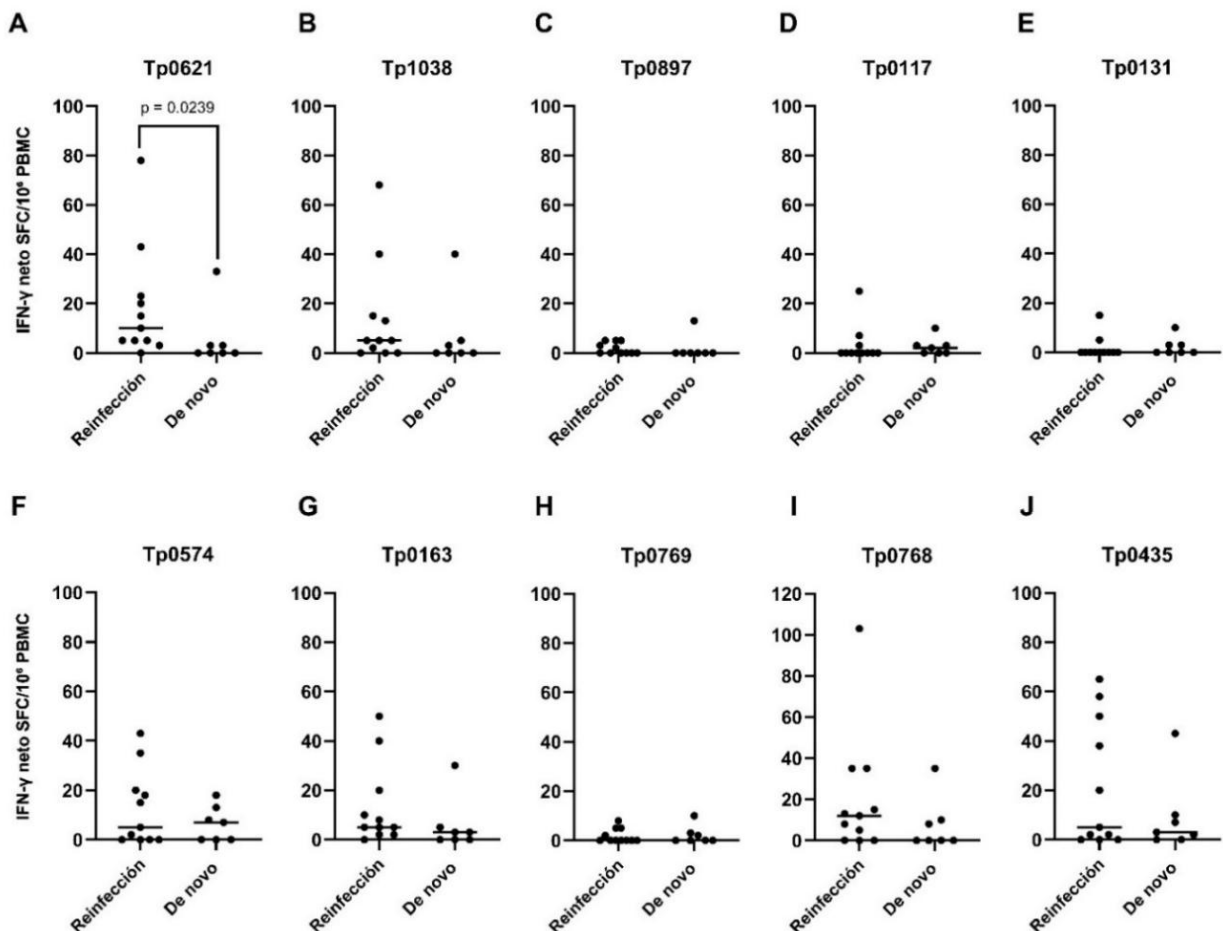


Figura 4. Producción neta de IFN- γ inducida por antígenos recombinantes de *T. pallidum* en respondedores a TpS según historial de infección. IFN- γ medido por ELISpot en PBMCs de participantes con sífilis activa respondedores a TpS (n = 18). Se muestran las respuestas frente a 11 antígenos recombinantes, así como con TpS y PHA. (A) Subgrupo de reinfección (n = 11). (B) Subgrupo de infección *de novo* (n = 7). Los resultados se expresan como SFC/10⁶ PBMC y corresponden a valores netos tras la corrección de fondo. Cada punto representa un participante individual; las barras indican la media $\pm$ SEM. Abreviaturas: IFN- γ , interferón gamma; PBMCs, células mononucleares de sangre periférica; PHA, fitohemaglutinina; SEM, error estándar de la media; SFC, células formadoras de spots; TpS, sonicado de *T. pallidum*.

La magnitud de la respuesta de IFN- γ se comparó entre los subgrupos de reinfección (n = 11) e infección *de novo* (n = 7) mediante la prueba U de Mann–Whitney (Figura 5). La producción neta de IFN- γ fue significativamente mayor en el subgrupo de reinfección frente a Tp0621 ($p = 0.0239$; Figura 5A), Tp0954 ($p = 0.0216$; Figura 5K) y TpS ($p = 0.0349$; Figura 5L), respecto al subgrupo de infección *de novo*. En el caso de Tp0954, esta diferencia estuvo influida por una respuesta de alta magnitud en un participante con reinfección (Figura 5K). Para los demás antígenos recombinantes evaluados y para PHA, no se encontraron diferencias significativas entre los subgrupos ($p > 0.05$).



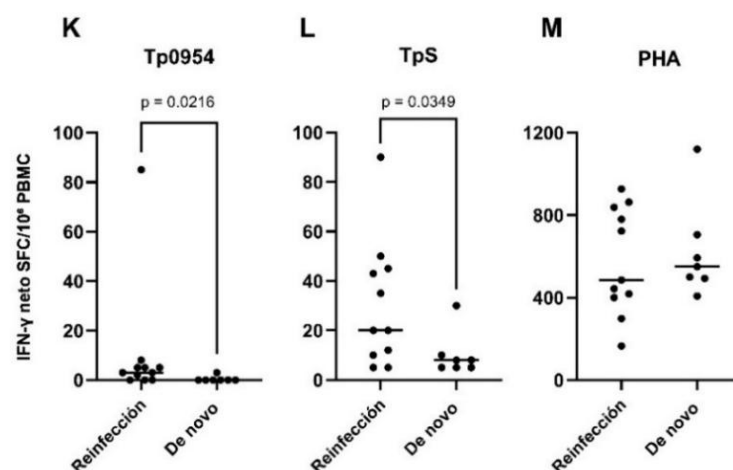


Figura 5. Comparación de la producción neta de IFN- γ en respondedores a TpS según historial de infección. IFN- γ medido por ELISpot en PBMCs de participantes con sífilis activa respondedores a TpS ($n = 18$). Se compararon las respuestas entre los subgrupos de reinfección ($n = 11$) e infección *de novo* ($n = 7$) frente a 11 antígenos recombinantes de *T. pallidum* (paneles A–K), así como con TpS (panel L) y PHA (panel M). Los resultados se expresan como SFC/10⁶ PBMC y corresponden a valores netos tras la corrección de fondo. Cada punto representa un participante individual; las líneas horizontales indican la mediana. Las comparaciones entre subgrupos se realizaron mediante la prueba U de Mann–Whitney (dos colas). Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Abreviaturas: IFN- γ , interferón gamma; PBMCs, células mononucleares de sangre periférica; PHA, fitohemaglutinina; SFC, células formadoras de spots; TpS, sonicado de *T. pallidum*.

5.5 Correlación de la respuesta de IFN- γ frente a antígenos recombinantes de *T. pallidum*

Dentro del grupo de participantes respondedores a TpS ($n = 18$), se realizó un análisis exploratorio para identificar patrones de asociación en la producción neta de IFN- γ frente a los 11 antígenos recombinantes de *T. pallidum*, mediante el cálculo de los coeficientes de correlación de Spearman (r) entre cada par de antígenos (Figura 6); los valores de p correspondientes se presentan en la Tabla 6. El análisis reveló correlaciones fuertes y estadísticamente significativas ($r \geq 0.80$; $p < 0.001$) entre varios pares de antígenos, destacando Tp0621–Tp0768 ($r = 0.86$), Tp0163–Tp0768 ($r = 0.85$), Tp0435–Tp0768 ($r = 0.82$), Tp0621–Tp0163 ($r = 0.81$) y Tp0621–Tp0954 ($r = 0.80$).

Asimismo, los antígenos que previamente mostraron diferencias significativas según el historial de infección (Tp0621 y Tp0954) presentaron correlaciones positivas moderadas ($r = 0.60$ – 0.79) con otros antígenos del panel. En particular, Tp0621 se correlacionó con Tp0435 ($r = 0.76$) y Tp1038 ($r = 0.71$). Por su parte, Tp0954 mostró correlaciones con Tp1038 ($r = 0.68$), Tp0435 ($r = 0.68$) y Tp0768 ($r = 0.60$); estas asociaciones deben interpretarse con cautela debido a la

distribución asimétrica de la respuesta frente a Tp0954. En contraste, otros pares de antígenos presentaron correlaciones bajas o no significativas, lo que evidencia la heterogeneidad en los patrones de respuesta frente a los antígenos evaluados.

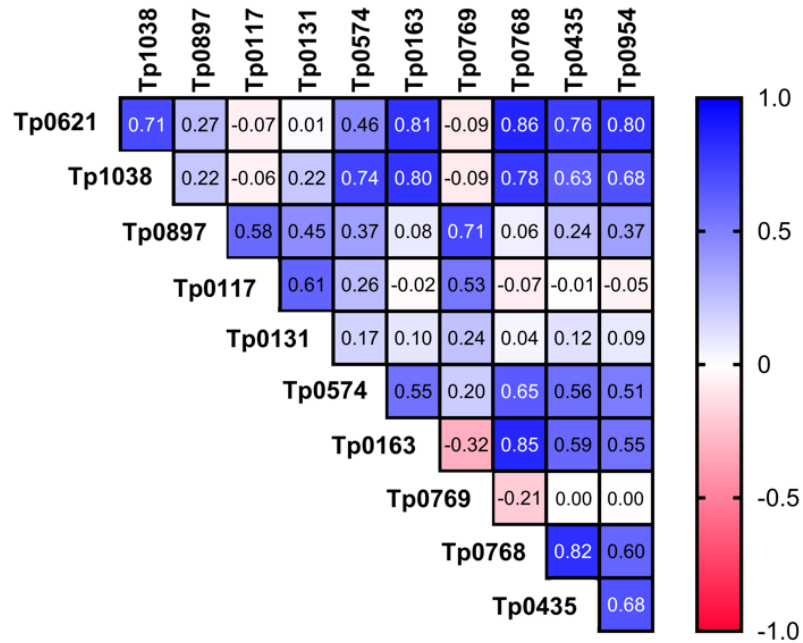


Figura 6. Matriz de correlación de la producción neta de IFN- γ frente a antígenos recombinantes de *T. pallidum*. Se presentan los coeficientes de correlación de Spearman (r) para cada par de los 11 antígenos recombinantes, calculados en participantes con sífilis activa respondedores a TpS ($n = 18$). Cada celda muestra el valor de r . La escala de color indica la dirección y magnitud de la correlación en un rango de -1 a 1 (azul: positiva; rojo: negativa).

Tabla 6. Valores de p de las correlaciones entre pares de antígenos recombinantes de *T. pallidum*

Valores p	Tp1038	Tp0897	Tp0117	Tp0131	Tp0574	Tp0163	Tp0769	Tp0768	Tp0435	Tp0954
Tp0621	< 0.001	0.2851	0.7957	0.9542	0.0529	< 0.001	0.7347	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Tp1038		0.3880	0.8212	0.3861	< 0.001	< 0.001	0.7347	< 0.001	0.0048	0.0019
Tp0897			0.0115	0.0632	0.1288	0.7473	< 0.001	0.8076	0.3329	0.1286
Tp0117				0.0072	0.2889	0.9477	0.0238	0.7736	0.9813	0.8305
Tp0131					0.4938	0.6954	0.3350	0.8816	0.6491	0.7356
Tp0574						0.0174	0.4322	0.0037	0.0159	0.0304
Tp0163							0.1993	< 0.001	0.0096	0.0192
Tp0769								0.4084	0.9925	0.9921
Tp0768									< 0.001	0.0090
Tp0435										0.0021

Nota: Valores de p correspondientes a los coeficientes de correlación de Spearman presentados en la Figura 6 ($n = 18$). Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$; los valores inferiores a 0.001 se reportan como < 0.001.

VI. DISCUSIÓN

En el Perú, la sífilis representa un desafío persistente de salud pública, con transmisión activa especialmente en poblaciones clave como HSH y mujeres trans (10,11). Aunque el diagnóstico serológico es útil, aún presenta limitaciones (19,46). A la ausencia de una vacuna eficaz se suma la necesidad de priorizar antígenos de *T. pallidum* con evidencia de respuestas celulares funcionales en humanos (25,31). En este estudio, la detección y cuantificación de IFN- γ en PBMCs de pacientes con sífilis activa permitió evaluar la inmunogenicidad celular de proteínas recombinantes. Esto aporta información para priorizar antígenos candidatos con posible aplicación diagnóstica y vacunal.

Se han descrito varias proteínas de *T. pallidum* con potencial inmunogénico, entre ellas antígenos clásicos como Tp0574 (Tp47) y Tp0435 (Tp17), además de miembros de la familia Tpr, principalmente a partir de evidencia serológica y estudios en modelos animales (27,32,37). Sin embargo, su capacidad de inducir respuestas celulares en humanos ha sido escasamente evaluada (22,31). En ese sentido, este estudio es una de las primeras evaluaciones funcionales de un panel de 11 proteínas recombinantes de *T. pallidum* previamente reportadas como inmunogénicas (25,27,32), con el fin de identificar qué antígenos inducen respuestas celulares medibles durante la infección activa.

El IFN- γ es una citocina clave en las respuestas de tipo Th1 asociadas al control de patógenos persistentes; en la sífilis, se ha descrito una respuesta celular compatible con un perfil Th1/IFN- γ (22,47). Por ello, su medición por ELISpot permitió evaluar de manera funcional la inmunogenicidad celular inducida por proteínas recombinantes de *T. pallidum*. Esto aportó información sobre la frecuencia y magnitud de las respuestas observadas durante la sífilis activa.

En los participantes con sífilis activa, las 11 proteínas recombinantes indujeron producción detectable de IFN- γ , con marcada heterogeneidad interindividual en la magnitud de la respuesta. Esta variabilidad podría explicarse por factores propios del hospedero y del contexto clínico, como la exposición previa a *T. pallidum*, el estadio clínico de la infección y el estado inmunológico basal (22,48). A esto se suma la diversidad del complejo mayor de histocompatibilidad humano (HLA), que

podría influir en la presentación de péptidos antigénicos y, por tanto, en la magnitud de la respuesta celular (31,49).

Estos factores también podrían ayudar a explicar la ausencia de respuesta detectable frente al estímulo poliantigénico TpS en aproximadamente un tercio de los participantes con sífilis activa. Este hallazgo podría reflejar variabilidad biológica individual, asociada a una baja frecuencia de linfocitos T específicos, hiporrespuesta o posible anergia (50), sin descartar la influencia de factores técnicos relacionados con el ensayo ELISpot (51). Entre estos factores, debe considerarse que la viabilidad celular fue evaluada mediante exclusión con azul de tripán, método que permite estimar la viabilidad global a partir de la integridad de la membrana celular, pero no discrimina eventos tempranos de muerte celular, como la apoptosis temprana (45). Métodos alternativos, como la citometría de flujo con colorantes de exclusión de membrana, entre ellos 7-AAD o yoduro de propidio, y marcaje con anexina V, así como sistemas automatizados de conteo celular, habrían permitido una evaluación más detallada de la viabilidad e integridad celular en muestras criopreservadas (52). Sin embargo, estos métodos no fueron empleados debido a que el procedimiento utilizado correspondió al protocolo previamente estandarizado para el ensayo ELISpot, fue accesible y permitió una evaluación rápida de la viabilidad antes de la siembra celular. Asimismo, la funcionalidad global de las PBMCs fue respaldada dentro del ensayo mediante una respuesta adecuada al control positivo PHA.

Adicionalmente, la coinfección por VIH podría haber contribuido parcialmente a la ausencia de respuesta frente a TpS observada en algunos participantes, considerando su potencial efecto modulador sobre la respuesta inmune celular, particularmente en las respuestas mediadas por linfocitos T CD4⁺ (53). Entre los no respondedores a TpS, algunos individuos con VIH tenían supresión virológica y recuentos conservados de linfocitos T CD4⁺, mientras que otros eran VIH negativos. Esto sugiere que la coinfección por VIH no explicaría por sí sola la ausencia de respuesta detectable en todos los casos. También podrían contribuir a la heterogeneidad observada otros factores vinculados con el estado inmunológico y el contexto clínico del hospedero.

Las respuestas de IFN- γ no se distribuyeron de manera uniforme entre los antígenos; más bien, se concentraron en un subconjunto de ellos. Esto sugiere una jerarquía de reconocimiento antigénico compatible con un patrón de inmunodominancia. En la infección por *T. pallidum*, este fenómeno se ha descrito previamente, ya que la respuesta adaptativa suele dirigirse a un repertorio limitado de antígenos inmunorreactivos (27,32,54). En los respondedores a TpS, los antígenos que destacaron con las mayores frecuencias de respuesta fueron Tp0163 (TroA, componente periplásmico del transportador TroABC) (32), Tp0435 (Tp17, lipoproteína periplásmica de 17 kDa; adhesina putativa) (55) y Tp0621 (TprJ/fragmento 5', proteína de membrana externa; porina putativa de la familia Tpr) (32). Esta mayor frecuencia de respuesta frente a estos antígenos sugiere que podrían integrar un repertorio reconocido con preferencia durante la infección activa, posiblemente por la presencia de epítomos reconocidos de manera más consistente por células inmunes del hospedero y por diferencias en su disponibilidad, procesamiento y presentación antigénica. Aunque este estudio no evaluó directamente estos mecanismos, la localización subcelular propuesta de estas proteínas en compartimentos como membrana externa, espacio periplásmico y membrana interna es coherente con su posible contribución al repertorio antigénico disponible para el reconocimiento por linfocitos T durante la infección (31,47,54).

En concordancia con estos hallazgos, existe evidencia previa en humanos que ubica a Tp0163/TroA, Tp0435/Tp17 y Tp0621/TprJ dentro del repertorio de antígenos inmunogénicos reconocidos durante la infección por sífilis (31,32,56,57). En particular, Tp0435 y Tp0621 cuentan con evidencia tanto humoral como celular (31,32). Tp0435 ha sido empleado ampliamente como antígeno inmunodominante en pruebas treponémicas basadas en proteínas recombinantes (32) y también se ha descrito como blanco de respuestas de linfocitos T CD4⁺ en humanos (31). Por su parte, para Tp0621 se han identificado fragmentos de TprJ reconocidos por linfocitos T en humanos (31). Además, su pertenencia a la familia Tpr y su localización putativa en membrana externa resultan relevantes, ya que proteínas de esta familia han sido vinculadas con procesos de interacción hospedero-patógeno y evasión inmune, lo que podría favorecer su disponibilidad y reconocimiento como blanco antigénico durante la infección (32). Estos antecedentes son coherentes con

las altas frecuencias de respuesta de IFN- γ observadas en este estudio y refuerzan el interés de Tp0435 y Tp0621 como antígenos candidatos para estudios posteriores sobre inmunidad celular y diseño vacunal (31,58).

Para Tp0163/TroA, la evidencia previa proviene principalmente de estudios serológicos. Aun así, se ha reportado un patrón de reactividad similar al de otros antígenos inmunodominantes, incluido Tp0435, además de asociaciones con marcadores serológicos como RPR (32). Esto sugiere que Tp0163 podría integrar el subconjunto de antígenos que concentran el reconocimiento inmunológico durante la infección. La respuesta de IFN- γ observada aporta evidencia funcional adicional sobre su reconocimiento celular.

Las diferencias según el historial de infección mostraron que la reinfección presentó una mayor magnitud de respuesta de IFN- γ frente a Tp0621 y, de manera más heterogénea, frente a Tp0954, en comparación con la infección *de novo*. Esto podría explicarse por un efecto de exposición previa a *T. pallidum*, en el que la reexposición favorecería la reactivación y expansión de linfocitos T de memoria, generando una respuesta de IFN- γ de mayor magnitud (31). En ese sentido, la reexposición puede modular de forma diferencial la respuesta celular frente a antígenos específicos (7,59). Aunque la reinfección se asoció con una mayor respuesta de IFN- γ , esta no necesariamente confiere una inmunidad esterilizante (60,61), lo cual es coherente con los mecanismos de evasión inmune y persistencia descritos para *T. pallidum* (22,47). El hecho de que Tp0621, pero no Tp0163 ni Tp0435, mostrara una diferencia significativa entre reinfección e infección *de novo* podría explicarse por el carácter antígeno-específico de la memoria celular (31). Aunque Tp0163 y Tp0435 presentaron altas frecuencias de respuesta en los respondedores a TpS, esto podría reflejar un reconocimiento amplio durante la infección activa, independientemente del historial de infección, en concordancia con su reconocimiento inmunológico previo descrito en humanos (32). En contraste, Tp0621 podría ser más sensible al efecto de la reexposición, de manera que los episodios previos de infección favorecerían una respuesta de memoria de mayor magnitud en participantes con reinfección (7,59). Por ello, que un antígeno tenga alta frecuencia de respuesta no siempre implica una diferencia significativa

entre grupos, ya que puede ser reconocido en ambos, pero inducir magnitudes similares o parcialmente solapadas de IFN- γ .

Finalmente, el análisis de correlación entre las respuestas de IFN- γ frente a las proteínas recombinantes de *T. pallidum* mostró que Tp0621, Tp0163 y Tp0435 concentraron las principales asociaciones moderadas a fuertes con otros antígenos del panel. Estos antígenos podrían formar parte de un patrón coordinado de respuesta celular (31) y servir de base para estudios posteriores sobre combinaciones multiantígeno con fines vacunales (62).

Las proteínas recombinantes de *T. pallidum* fueron capaces de inducir *in vitro* respuestas celulares compatibles con un perfil Th1/IFN- γ . Estos hallazgos aportan evidencia funcional en humanos con sífilis y permiten comprender mejor el reconocimiento antigénico, delimitar un repertorio con inmunogenicidad celular demostrada y priorizar antígenos candidatos con potencial aplicación en estudios orientados al desarrollo de herramientas inmunodiagnósticas y al diseño de vacunas contra la sífilis. Los resultados deben validarse en estudios con mayor tamaño muestral para confirmar su consistencia.

VII. CONCLUSIONES

- Las once proteínas recombinantes de *T. pallidum* evaluadas mostraron inmunogenicidad celular al inducir producción detectable de IFN- γ en PBMCs de personas con sífilis activa, con respuestas variables entre individuos y antígenos.
- En los respondedores a TpS (n = 18), Tp0163 (TroA), Tp0435 (Tp17) y Tp0621 (TprJ) concentraron las mayores frecuencias de respuesta de IFN- γ , compatible con un patrón de inmunodominancia antigénica.
- En los respondedores a TpS (n = 18), la reinfección se asoció con una mayor magnitud de respuesta de IFN- γ frente a Tp0621 y Tp0954, en comparación con la infección *de novo*. Este patrón podría reflejar una respuesta de memoria inmunológica asociada a la reexposición.
- En los respondedores a TpS (n = 18), el análisis exploratorio de correlación mostró patrones de asociación entre las respuestas de IFN- γ frente a los

antígenos evaluados, compatibles con un reconocimiento celular parcialmente coordinado.

VIII. LIMITACIONES

Debe considerarse como limitación el uso de PBMCs criopreservadas, ya que en los ensayos funcionales de inmunidad celular *in vitro* es frecuente trabajar con células congeladas y luego descongeladas, procesos que pueden afectar la recuperación, viabilidad y funcionalidad celular. Por este motivo, las muestras se procesaron siguiendo protocolos previamente estandarizados. Antes de incluirlas en el ELISpot, se verificó que cumplieran los criterios definidos de viabilidad celular: $\geq 80\%$ o $\geq 60\%$ cuando una respuesta adecuada al control positivo PHA confirmó la funcionalidad celular. Con ello, se buscó limitar el impacto de la criopreservación sobre las mediciones obtenidas.

Otra limitación fue el tamaño muestral, que redujo la potencia estadística y la precisión de las estimaciones, especialmente en los análisis restringidos a los respondedores a TpS ($n = 18$) y en las comparaciones entre reinfección e infección *de novo*. Aun así, fue posible identificar respuestas diferenciales según el historial de infección y patrones de reconocimiento antigénico. Estos resultados deben interpretarse como evidencia preliminar y confirmarse en estudios con mayor tamaño muestral.

Finalmente, el diseño transversal no permitió evaluar la dinámica de las respuestas de IFN- γ a lo largo del tiempo ni según el historial de infección. Aun así, la medición realizada en un momento definido de la infección sirve como base para futuros estudios longitudinales.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peeling RW, Mabey D, Chen XS, Garcia PJ. Syphilis. *Lancet*. 2023; 22;402(10398):336–46. doi: 10.1016/S0140-6736(22)02348-0.
2. World Health Organization. Implementing the global health sector strategies on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2022–2030: report on progress and gaps 2024, second edition. Geneva: WHO; 2024. Disponible en: <https://iris.who.int/handle/10665/378246>
3. Zambrano Alava SN, Ruiz Alava KJ, Mina Ortiz JB, Jaime Mora VA. Sífilis congénita en América Latina: prevalencia, factores de riesgo y complicaciones en la salud materno-fetal. *BIOSANA*. 2024;4(4):104-19. doi: 10.62305/biosana.v4i4.204.
4. Pan American Health Organization. Guidance for the Elimination of Syphilis and Congenital Syphilis in the Americas. Washington, DC: PAHO; 2024. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/61824>.
5. Chirskaia MA, Yastrebova EB, Krasnoselskikh TV, Danilyuk MI. Current characteristics of the HIV/syphilis co-infection epidemic. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2023;15(3):15-25. (In Russ.). doi: 10.22328/2077-9828-2023-15-3-15-25.
6. Tsuboi M, Evans J, Davies EP, Rowley J, Korenromp EL, Clayton T, Taylor MM, Mabey D, Chico RM. Prevalence of syphilis among men who have sex with men: a global systematic review and meta-analysis from 2000–20. *Lancet Glob Health*. 2021;9(8):e1110–e1118. doi: 10.1016/S2214-109X(21)00221-7.
7. Marra CM, Maxwell CL, Sahi SK, Tantalo LC, Dunaway SB, Lukehart SA. Previous Syphilis Alters the Course of Subsequent Episodes of Syphilis. *Clin Infect Dis*. 2019;71(5):1243-1247. doi: 10.1093/cid/ciz943. [Corrected in *Clin Infect Dis*. 2021;73(3):561. doi: 10.1093/cid/ciaa1891]
8. Kenyon C, Osbak KK, Apers L. Repeat Syphilis Is More Likely to Be Asymptomatic in HIV-Infected Individuals: A Retrospective Cohort Analysis With Important Implications for Screening. *Open Forum Infect Dis*. 2018;5(6): ofy096. doi: 10.1093/ofid/ofy096.

9. Wu Y, Lu L, Song X, Liu X, Yang Y, Chen L, Tang J, Han Y, Lv W, Cao W, Li T. Clinical and immunological characteristics of HIV/syphilis co-infected patients following long-term antiretroviral treatment. *Front Public Health*. 2024;11:1327896. doi: 10.3389/fpubh.2023.1327896.
10. Pizzicato LN, Vagenas P, Gonzales P, Lama JR, Pun M, Sanchez J, Altice FL. Active syphilis and its association with HIV and sexual risk behaviours in a multicity sample of men who have sex with men and transgender women in Peru. *Sex Health*. 2017;14(4):304–312. doi: 10.1071/SH16149.
11. Hung P, Osias E, Konda KA, Calvo GM, Reyes-Díaz EM, Vargas SK, Goldbeck C, Caceres CF, Klausner JD. High Lifetime Prevalence of Syphilis in Men Who Have Sex With Men and Transgender Women Versus Low Lifetime Prevalence in Female Sex Workers in Lima, Peru. *Sex Transm Dis*. 2020;47(8):549-555. doi: 10.1097/OLQ.0000000000001200.
12. Kojima N, Park H, Konda KA, Joseph Davey DL, Bristow CC, Brown B, Leon SR, Vargas SK, Calvo GM, Caceres CF, Klausner JD. The PICASSO Cohort: baseline characteristics of a cohort of men who have sex with men and male-to-female transgender women at high risk for syphilis infection in Lima, Peru. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):255. doi: 10.1186/s12879-017-2332-x.
13. Ministerio de Salud (MINSA), Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades (CDC). Boletín Epidemiológico del Perú SE 48-2021. Lima: CDC–MINSA;2021. Disponible en: https://epipublic.dge.gob.pe/uploads/boletin/boletin_202148_10_180033.pdf
14. Schmidt R, Carson PJ, Jansen RJ. Resurgence of Syphilis in the United States: An Assessment of Contributing Factors. *Infect Dis (Auckl): Research and Treatment*. 2019;12: 1178633719883282. doi:10.1177/1178633719883282.
15. Storm M, Deuba K, Damas J, Shrestha U, Rawal B, Bhattarai R, Marrone G. Prevalence of HIV, syphilis, and assessment of the social and structural determinants of sexual risk behaviour and health service utilisation among MSM and transgender women in Terai highway districts of Nepal: findings based on an integrated biological and behavioural surveillance survey using respondent driven sampling. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):402. doi: 10.1186/s12879-020-05122-3.

16. Huamaní-Chavez V, Rueda-Torres L, Ormeño-Delgado L, Li J, Rosales-Rimache J. Syphilis seroprevalence and associated factors: A cross-sectional study in formal female sex workers in a province of Peru. *Medicine (Baltimore)*. 2024;103(15): e37774. doi: 10.1097/MD.00000000000037774.
17. Ghanem KG, Ram S, Rice PA. The Modern Epidemic of Syphilis. *N Engl J Med*. 2020;382(9):845–854. doi: 10.1056/NEJMra1901593.
18. Rana A, Deb M. A Review on Syphilis: Clinical Manifestation and Epidemiology. *J Pharm Res Int*. 2021;33(60B):64–70. doi: 10.9734/jpri/2021/v33i60B34587.
19. Workowski KA, Bachmann LH, Chan PA, Johnston CM, Muzny CA, Park I, Reno H, Zenilman JM, Bolan GA. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. *MMWR Recomm Rep*. 2021;70(4):1-187. doi: 10.15585/mmwr.rr7004a1.
20. Khaw C, Malden C, Ratnayake M, Boyd M. Diagnosis and Management of Syphilis in Patients With HIV Co-infection. *Curr Treat Options Infect Dis*. 2020; 12:215-226. doi: 10.1007/s40506-020-00225-6.
21. Kenyon C, Osbak KK, Crucitti T, Kestens L. Syphilis reinfection is associated with an attenuated immune profile in the same individual: a prospective observational cohort study. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):479. doi: 10.1186/s12879-018-3399-8.
22. Kaminiów K, Kiołbasa M, Pastuszczyk M. The Significance of the Cell-Mediated Host Immune Response in Syphilis. *Microorganisms*. 2024;12(12):2580. doi: 10.3390/microorganisms12122580.
23. New York City Department of Health and Mental Hygiene, Bureau of Sexually Transmitted Infections; New York City STD Prevention Training Center. The Diagnosis and Management of Syphilis: An Update and Review. New York: New York City Department of Health and Mental Hygiene; 2019. Disponible en: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/112320>
24. Aqeeli FI, Bohassan IT, Alanzi AFK, Hassany SAY, Harthi AA, Hazazi HMA, et al. An Updated Review on the Diagnosis of Syphilis: A Sexually Transmitted Infection. *Journal of Medicinal and Chemical Sciences*. 2024;7(12):1834–1846. doi: 10.26655/JMCHEMSCI.2024.12.6.

25. Osias E, Hung P, Giacani L, Stafylis C, Konda KA, Vargas SK, Reyes-Díaz EM, Comulada WS, Haake DA, Haynes AM, Caceres CF, Klausner JD. Investigation of syphilis immunology and *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* biology to improve clinical management and design a broadly protective vaccine: study protocol. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):444. doi: 10.1186/s12879-020-05141-0.
26. Queiroz JHFS, Correa ME, Ferreira TDS, Marques MF, Barbosa MDS, Marchioro SB, Simionatto S. Detection of *Treponema pallidum* in whole blood samples of patients with syphilis by the polymerase chain reaction. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2022;64:e75. doi: 10.1590/S1678-9946202264075.
27. Campo JJ, Romeis E, Oberai A, Pablo JV, Hung C, Teng AA, Shandling AD, Phan A, Haynes AM, Giacani L. A novel pan-proteome array for high-throughput profiling of the humoral response to *Treponema pallidum*. *iScience.* 2024;27(9):110618. doi: 10.1016/j.isci.2024.110618.
28. Pipitò L, Medaglia AA, Trizzino M, Bonura S, Gioè C, Di Carlo P, Colomba C, Cascio A. A case of syphilis associated with immune reconstitution inflammatory syndrome and review of the literature. *AIDS Res Ther.* 2023;20(1):28. doi: 10.1186/s12981-023-00522-2.
29. Gallais Sérézal I, Kirma J, Sarkar MK, Cole C, Xing X, Bogle R, Fox J, Coon A, vanStraalen KR, Dobry C, Xu LH, Kahlenberg JM, Harms PW, Billi AC, Tsoi LC, Giacani L, Gudjonsson JE. Characterizing the immune infiltrate in secondary syphilis: implications for transmission and pathology. *Front Immunol.* 2025;16:1549206. doi: 10.3389/fimmu.2025.1549206.
30. Zheng YW, Zheng XQ, Guo YF, Xie JW, Wang M, Xu QY, Zhu XZ, Lin LR. Characteristics of immune response and pathogen tissue dissemination during progressive *Treponema pallidum* infection: Insights from humanized mice. *Scand J Immunol.* 2025;101(3):e70005. doi: 10.1111/sji.70005.
31. Reid TB, Godornes C, Campbell VL, Laing KJ, Tantaló LC, Gomez A, et al. *Treponema pallidum* Periplasmic and Membrane Proteins Are Recognized by Circulating and Skin CD4⁺ T Cells. *J Infect Dis.* 2024;230(2):281-292. doi: 10.1093/infdis/jiae245.

32. Haynes AM, Konda KA, Romeis E, Siebert J, Vargas SK, Reyes Diaz M, Phan A, Caceres CF, Giacani L, Klausner JD. Evaluation of a minimal array of *Treponema pallidum* antigens as biomarkers for syphilis diagnosis, infection staging, and response to treatment. *Microbiol Spectr.* 2024;12(1):e0346623. doi: 10.1128/spectrum.03466-23.
33. Hawley KL, Montezuma-Rusca JM, Delgado KN, Singh N, Uversky VN, Caimano MJ, Radolf JD, Luthra A. Structural modeling of the *Treponema pallidum* outer membrane protein repertoire: A road map for deconvolution of syphilis pathogenesis and development of a syphilis vaccine. *J Bacteriol.* 2021;203(15):e0008221. doi: 10.1128/JB.00082-21.
34. Drago F, Javor S, Parodi A. Relevance in biology and mechanisms of immune and treatment evasion of *Treponema pallidum*. *G Ital Dermatol Venereol.* 2019;154(5):573-580. doi: 10.23736/S0392-0488.17.05830-8.
35. Addetia A, Lin MJ, Phung Q, Xie H, Huang ML, Ciccarese G, Dal Conte I, Cusini M, Drago F, Giacani L, Greninger AL. Estimation of Full-Length TprK Diversity in *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *mBio.* 2020;11(5):e02726-20. doi: 10.1128/mBio.02726-20.
36. Romeis E, Lieberman NAP, Molini B, Tantalo LC, Chung B, Phung Q, Avendaño C, Vorobieva A, Greninger AL, Giacani L. *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* with an Artificially impaired TprK antigenic variation system is attenuated in the Rabbit model of syphilis. *PLoS Pathog.* 2023;19(3):e1011259. doi: 10.1371/journal.ppat.1011259.
37. Chen J, Huang J, Liu Z, Xie Y. *Treponema pallidum* outer membrane proteins: current status and prospects. *Pathog Dis.* 2022;80(1):ftac023. doi: 10.1093/femspd/ftac023.
38. Wu S, Luo L, Ye F, Wang Y, Li D. Comprehensive Overview of *Treponema pallidum* Outer Membrane Proteins. *Curr Protein Pept Sci.* 2024;25(8):604–612. doi: 10.2174/0113892037293502240328042224.
39. Gomes LGR, Rodrigues TCV, Jaiswal AK, Santos RG, Kato RB, Barh D, Alzahrani KJ, Banjer HJ, Soares SC, Azevedo V, Tiwari S. In Silico Designed

- Multi-Epitope Immunogen “Tpme-VAC/LGCM-2022” May Induce Both Cellular and Humoral Immunity against *Treponema pallidum* Infection. *Vaccines* (Basel). 2022;10(7):1019. doi: 10.3390/vaccines10071019.
40. Lukehart SA, Molini B, Gomez A, Godornes C, Hof R, Fernandez MC, Pitner RA, Gray SA, Carter D, Giacani L, Cameron CE. Immunization with a tri-antigen syphilis vaccine significantly attenuates chancre development, reduces bacterial load, and inhibits dissemination of *Treponema pallidum*. *Vaccine*. 2022;40(52):7676-7692. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.11.002.
 41. He Y, Chen D, Fu Y, Huo X, Zhao F, Yao L, Zhou X, Qi P, Yin H, Cao L, Ling H, Zeng T. Immunization with Tp0954, an adhesin of *Treponema pallidum*, provides protective efficacy in the rabbit model of experimental syphilis. *Front Immunol*. 2023; 14:1130593. doi: 10.3389/fimmu.2023.1130593.
 42. Wykes MN, Renia L. ELISPOT Assay to Measure Peptide-specific IFN- γ Production. *Bio Protoc*. 2017;7(11):e2302. doi: 10.21769/BioProtoc.2302.
 43. Houston S, Gomez A, Geppert A, Eshghi A, Smith DS, Waugh S, Hardie DB, Goodlett DR, Cameron CE. Deep proteome coverage advances knowledge of *Treponema pallidum* protein expression profiles during infection. *Sci Rep*. 2023;13(1):18259. doi: 10.1038/s41598-023-45219-8.
 44. Yi DY, Xu QY, He Y, Zheng XQ, Yang TC, Lin Y. *Treponema pallidum* protein Tp47 induced prostaglandin E2 to inhibit the phagocytosis in human macrophages. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2024;38(6):1166-1178. doi: 10.1111/jdv.19809.
 45. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015;111:A3.B.1-A3.B.3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111.
 46. Kersh EN, Workowski KA. Evidence Review for Centers for Disease Control and Prevention Guidance Development on Laboratory Testing to Detect *Treponema pallidum* Infection (Syphilis). *Clin Infect Dis*. 2020;71(Suppl 1):S1-S3. doi: 10.1093/cid/ciaa348.
 47. Liu A, Giacani L, Tuero I, Klausner JD. Syphilis Pathogenesis: Host Immune Response vs Pathogen Immune Evasion. *J Infect Dis*. 2025;232(4):760. doi:10.1093/infdis/jiaf388.

48. Kenyon C, Osbak KK, Crucitti T, Kestens L. The immunological response to syphilis differs by HIV status; a prospective observational cohort study. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):111. doi: 10.1186/s12879-017-2201-7.
49. Jiang HW, Tian HQ, Liu H, Li N, Zhao Y, Zhang FR. Association of the HLA-DRB1 locus with syphilis in a Chinese population. *International Journal of Infectious Diseases.* 2011;15(5):e342–5. doi:10.1016/j.ijid.2011.01.008.
50. Xia W, Zhao J, Su B, Jiao Y, Weng W, Zhang M, et al. Syphilitic infection impairs immunity by inducing both apoptosis and pyroptosis of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *Innate Immunity.* 2021;27(1):99–106. doi:10.1177/1753425920952840.
51. Rountree W, Berrong M, Sanchez AM, Denny TN, Ferrari G. Variability of the IFN- γ ELISpot assay in the context of proficiency testing and bridging studies. *J Immunol Methods.* 2016;433:69. doi:10.1016/j.jim.2016.03.004.
52. Cai Y, Prochazkova M, Kim YS, Jiang C, Ma J, Moses L, et al. Assessment and comparison of viability assays for cellular products. *Cytotherapy.* 2024;26(2):201-209. doi: 10.1016/j.jcyt.2023.11.008.
53. Buchacz K, Patel P, Taylor M, Kerndt PR, Byers RH, Holmberg SD, et al. Syphilis increases HIV viral load and decreases CD4 cell counts in HIV-infected patients with new syphilis infections. *AIDS.* 2004;18(15):2075-9. doi:10.1097/00002030-200410210-00012.
54. Salazar JC, Radolf JD. T-Cell Responses to *Treponema pallidum* Proteins in Blood and Skin to Advance Syphilis Vaccine Design: Learning From Nature. *J Infect Dis.* 2024;230(2):275. doi:10.1093/infdis/jiae246.
55. Zuo W, Xiao Y, Xiang Q, Xiao S, Xie Y. Participants in *Treponema pallidum* pathogenesis: progress in functional proteins. *Front Immunol.* 2025;16:1632677. doi:10.3389/fimmu.2025.1632677.
56. Keane JL, Bose M, Molini BJ, Konda KA, Vargas SK, Reyes Diaz M, et al. B-Cell Epitope Mapping of the *Treponema pallidum* Tp0435 Immunodominant Lipoprotein for Peptide-Based Syphilis Diagnostics. *Diagnostics.* 2025;15(11):1443. doi:10.3390/diagnostics15111443.

57. Arbuzova N V., Владимировна АН, Shpilevaya M V., Валентиновна ИИМ, Katunin GL, Леонидович КГ, et al. Assessment of *T. pallidum* recombinant proteins Trp0163 and Trp0971 as antigens for the diagnosis of syphilis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Vestn Dermatol Venerol.* 2024;100(6):53–60. doi:10.25208/vdv16813.
58. Liu A, Giacani L, Hawley KL, Cameron CE, Seña AC, Konda KA, et al. New Pathways in Syphilis Vaccine Development. *Sex Transm Dis.* 2024;51(11):e49–53. doi:10.1097/OLQ.0000000000002050.
59. Kenyon C, Tsoumanis A, Osbak K, Van Esbroeck M, Florence E, Crucitti T, et al. Repeat syphilis has a different immune response compared with initial syphilis: an analysis of biomarker kinetics in two cohorts. *Sex Transm Infect.* 2018;94(3):180–6. doi:10.1136/sextrans-2017-053312.
60. Kingston M, Apea V, Evans C, Fifer H, Foster K, Patrick P, et al. BASHH UK guidelines for the management of syphilis 2024. *Int J STD AIDS.* 2024;35(14):1142–60. doi:10.1177/09564624241280406.
61. Marchese V, Tiecco G, Storti S, Degli Antoni M, Calza S, Gulletta M, et al. Syphilis Infections, Reinfections and Serological Response in a Large Italian Sexually Transmitted Disease Centre: A Monocentric Retrospective Study. *J Clin Med.* 2022;11(24). doi:10.3390/jcm11247499.
62. Waugh S, Cameron CE. Syphilis vaccine development: Aligning vaccine design with manufacturing requirements. *Hum Vaccin Immunother.* 2024;20(1):2399915. doi:10.1080/21645515.2024.2399915.

ANEXOS

Anexo 1. Diseño experimental de la placa ELISpot de IFN- γ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	D: Sífilis negativa				A: Sífilis activa con reinfección				B: Sífilis activa con infección <i>de novo</i>			
A	(1) Tp0621	(1) Tp0621	(9) Tp0768	(9) Tp0768	(1) Tp0621	(1) Tp0621	(9) Tp0768	(9) Tp0768	(1) Tp0621	(1) Tp0621	(9) Tp0768	(9) Tp0768
B	(2) Tp1038	(2) Tp1038	(10) Tp0435	(10) Tp0435	(2) Tp1038	(2) Tp1038	(10) Tp0435	(10) Tp0435	(2) Tp1038	(2) Tp1038	(10) Tp0435	(10) Tp0435
C	(3) Tp0897	(3) Tp0897	(11) Tp0954	(11) Tp0954	(3) Tp0897	(3) Tp0897	(11) Tp0954	(11) Tp0954	(3) Tp0897	(3) Tp0897	(11) Tp0954	(11) Tp0954
D	(4) Tp0117	(4) Tp0117	TpS	TpS	(4) Tp0117	(4) Tp0117	TpS	TpS	(4) Tp0117	(4) Tp0117	TpS	TpS
E	(5) Tp0131	(5) Tp0131	PHA (C+)	PHA (C+)	(5) Tp0131	(5) Tp0131	PHA (C+)	PHA (C+)	(5) Tp0131	(5) Tp0131	PHA (C+)	PHA (C+)
F	(6) Tp0574	(6) Tp0574	Medio (C-)	Medio (C-)	(6) Tp0574	(6) Tp0574	Medio (C-)	Medio (C-)	(6) Tp0574	(6) Tp0574	Medio (C-)	Medio (C-)
G	(7) Tp0163	(7) Tp0163			(7) Tp0163	(7) Tp0163	(C2) Sin Ac. captura	(C3) Sin Ac. detección	(7) Tp0163	(7) Tp0163	(C4) Sin conjugado HRP	(C1) Medio solo
H	(8) Tp0769	(8) Tp0769			(8) Tp0769	(8) Tp0769	(C2) Sin Ac. captura	(C3) Sin Ac. detección	(8) Tp0769	(8) Tp0769	(C4) Sin conjugado HRP	(C1) Medio solo

Nota: Cada placa ELISpot de 96 pocillos permitió procesar muestras de PBMCs de tres participantes: (D) un participante sin evidencia clínica ni serológica de sífilis (sífilis negativa); (A) un participante con sífilis activa y antecedente de infección previa (reinfección); y (B) un participante con sífilis activa sin antecedente de infección previa (infección *de novo*). Las PBMCs de cada participante fueron estimuladas con 11 proteínas recombinantes de *T. pallidum*, sonicado de *T. pallidum* (TpS), PHA como control positivo mitogénico (C+) y medio R10 sin antígeno como control negativo (C-), con todas las condiciones evaluadas en duplicado técnico. Además, cada placa incluyó controles cromogénicos sin células para verificar la ausencia de señal inespecífica asociada al revelado: (C1) medio solo, (C2) sin anticuerpo de captura, (C3) sin anticuerpo de detección y (C4) sin conjugado enzimático HRP. La distribución permitió procesar las muestras de los participantes y las condiciones experimentales bajo un esquema uniforme por placa.

Anexo 2. Características demográficas, clínicas e inmunológicas individuales de los participantes del estudio, según grupos analizados (n = 40)

Código del participante	Grupos analizados	Grupo poblacional	Edad (años)	RPR (título) ^a	Episodios previos de sífilis	Estadio clínico de la sífilis	Estado serológico para VIH	Carga viral de VIH < 200 copias/mL ^b	Recuento de CD4 ≥ 350 células/μL ^b	Viabilidad celular de PBMC (%) ^c
A50010	A: Participantes con sífilis activa y antecedente (reinfección)	HSH	23	1:32	2	Sífilis secundaria	Positivo	Sí	Sí	90
A50030		HSH	27	1:32	1	Sífilis latente precoz	Positivo	Sí	Sí	90
A20460		HSH	32	1:32	1	Sífilis latente precoz	Positivo	Sí	Sí	90
A20420		HSH	26	1:8	3	Sífilis primaria	Positivo	Sí	Sí	90
A70070		HSH	30	1:8	1	Sífilis latente precoz	Positivo	Sí	Sí	78
A20360		HSH	37	1:2	2	Sífilis latente precoz	Positivo	No realizado	No realizado	90
A10300		HSH	36	1:4	1	Sífilis primaria	Positivo	No realizado	No realizado	85
A20390		MT	52	1:32	2	Sífilis latente precoz	Positivo	Sí	Sí	86
A50020		HSH	35	1:32	2	Sífilis secundaria	Positivo	Sí	No	97
A20400		HSH	43	1:16	5	Sífilis latente precoz	No realizado	No realizado	No realizado	80
A50080		HSH	26	1:32	2	Sífilis latente precoz	Positivo	Sí	Sí	100
A20430		HSH	42	1:32	2	Sífilis latente precoz	Positivo	Sí	Sí	92
A20470		HSH	36	1:64	1	Sífilis latente precoz	Positivo	Sí	Sí	67
A40500		MT	45	1:64	2	Sífilis secundaria	No realizado	No realizado	No realizado	64
A20450		HSH	43	1:16	1	Sífilis latente precoz	Positivo	No realizado	No realizado	78
B20240	B: Participantes con sífilis activa sin antecedente (infección <i>de novo</i>)	HSH	32	1:32	0	Sífilis latente precoz	Positivo	Sí	Sí	91
B70100		HSH	40	1:32	0	Sífilis latente precoz	Positivo	Sí	Sí	96
B70020		HSH	29	1:32	0	Sífilis secundaria	Negativo	No aplica	No aplica	61
B10230		HSH	28	1:2	0	Sífilis latente precoz	Positivo	No realizado	No realizado	80
B70180		HSH	34	1:2	0	Sífilis latente precoz	Positivo	Sí	Sí	98
B70150		HSH	26	1:4	0	Sífilis latente precoz	Negativo	No aplica	No aplica	92
B20210		HSH	36	1:128	0	Sífilis latente precoz	Negativo	No aplica	No aplica	85
B70030		HSH	28	1:64	0	Sífilis latente precoz	Positivo	Sí	Sí	60
B10250		HSH	33	1:64	0	Sífilis latente precoz	Positivo	No realizado	No realizado	77

B20220		HSH	36	1:4	0	Sífilis primaria	Negativo	No aplica	No aplica	96
B20200		HSH	29	1:16	0	Sífilis latente precoz	Negativo	No aplica	No aplica	87
B60010		HSH	30	1:64	0	Sífilis latente precoz	Negativo	No aplica	No aplica	95
D20110	D: Participantes sin evidencia clínica ni serológica de sífilis (sífilis negativa)	Hombre	47	No realizado	0	Sin evidencia clínica ni serológica de sífilis	Negativo	No aplica	No aplica	90
D70040		HSH	26	No realizado	0	Sin evidencia clínica ni serológica de sífilis	Positivo	No	Sí	60
D70050		HSH	28	No realizado	0	Sin evidencia clínica ni serológica de sífilis	Positivo	Sí	No	77
D70070		HSH	31	No realizado	0	Sin evidencia clínica ni serológica de sífilis	Positivo	Sí	Sí	95
D70090		HSH	32	No realizado	0	Sin evidencia clínica ni serológica de sífilis	Positivo	Sí	No	96
D50010		HSH	21	No reactivo	0	Sin evidencia clínica ni serológica de sífilis	Negativo	No aplica	No aplica	93
D70020		MT	25	No realizado	0	Sin evidencia clínica ni serológica de sífilis	Positivo	Sí	Sí	90
D40200		MT	27	No realizado	0	Sin evidencia clínica ni serológica de sífilis	Positivo	No realizado	No realizado	79
D70010		HSH	35	No realizado	0	Sin evidencia clínica ni serológica de sífilis	Positivo	No	No	95
D70030		HSH	41	No realizado	0	Sin evidencia clínica ni serológica de sífilis	Negativo	No aplica	No aplica	70
D50030		MT	57	No realizado	0	Sin evidencia clínica ni serológica de sífilis	Negativo	No aplica	No aplica	96
D70060		HSH	30	No realizado	0	Sin evidencia clínica ni serológica de sífilis	Negativo	No aplica	No aplica	100
D70100		HSH	43	No realizado	0	Sin evidencia clínica ni serológica de sífilis	Negativo	No aplica	No aplica	95

Abreviaturas: CD4, linfocitos T CD4⁺; HSH, hombres que tienen sexo con hombres; MT, mujeres trans; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; RPR, prueba rápida de reagina plasmática; VIH, virus de la inmunodeficiencia humana.

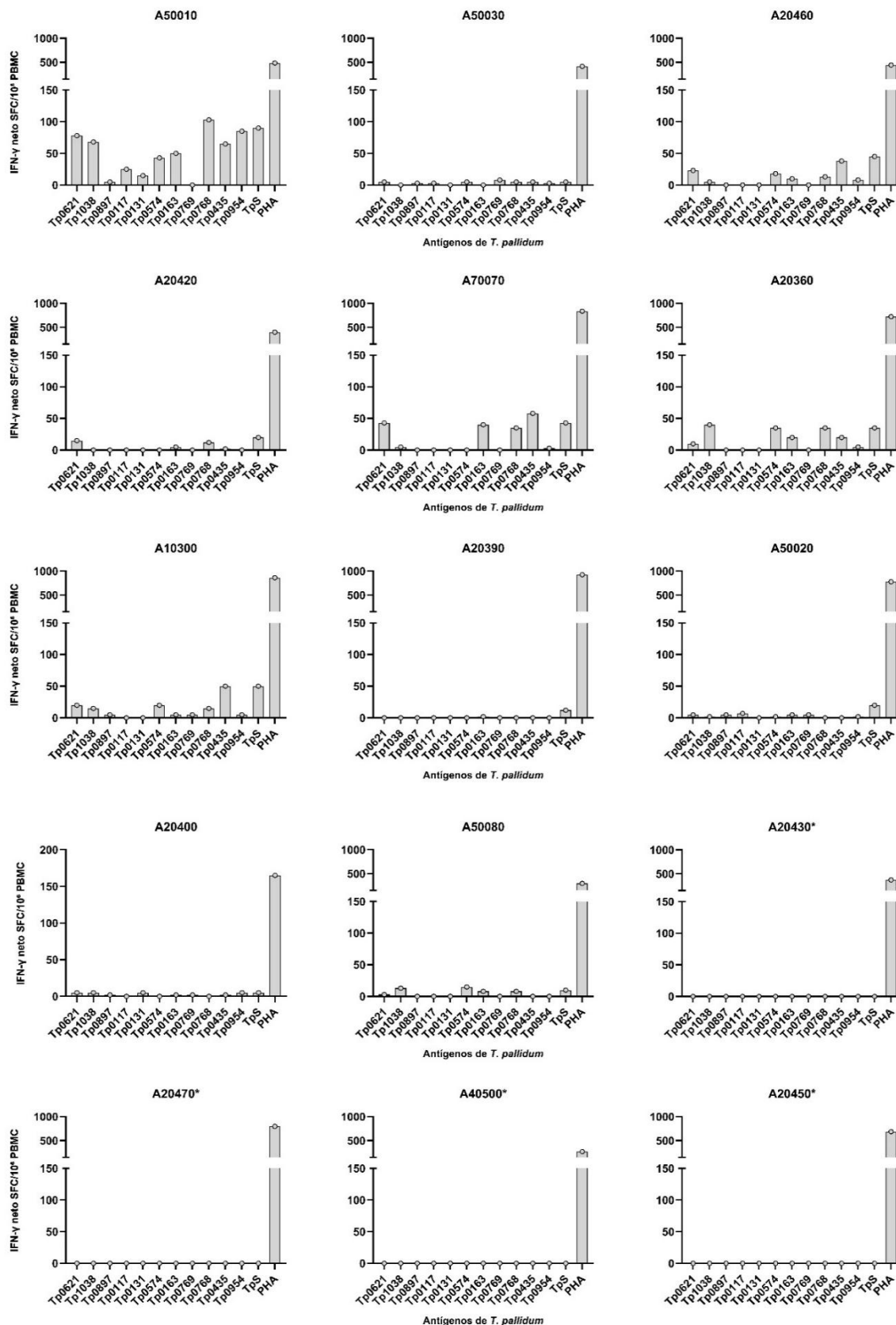
^aRPR reportado como título de dilución en participantes con sífilis activa; en el grupo sífilis negativa se consignó como “no reactivo” (resultado negativo del ensayo) o “no realizado” (prueba no efectuada).

^bLa carga viral de VIH y el recuento de linfocitos T CD4⁺ se evaluaron únicamente en participantes con VIH positivo; “no aplica” indica que la variable no corresponde a participantes VIH negativos.

^cLa viabilidad celular corresponde al porcentaje de PBMC viables al momento del procesamiento de la muestra.

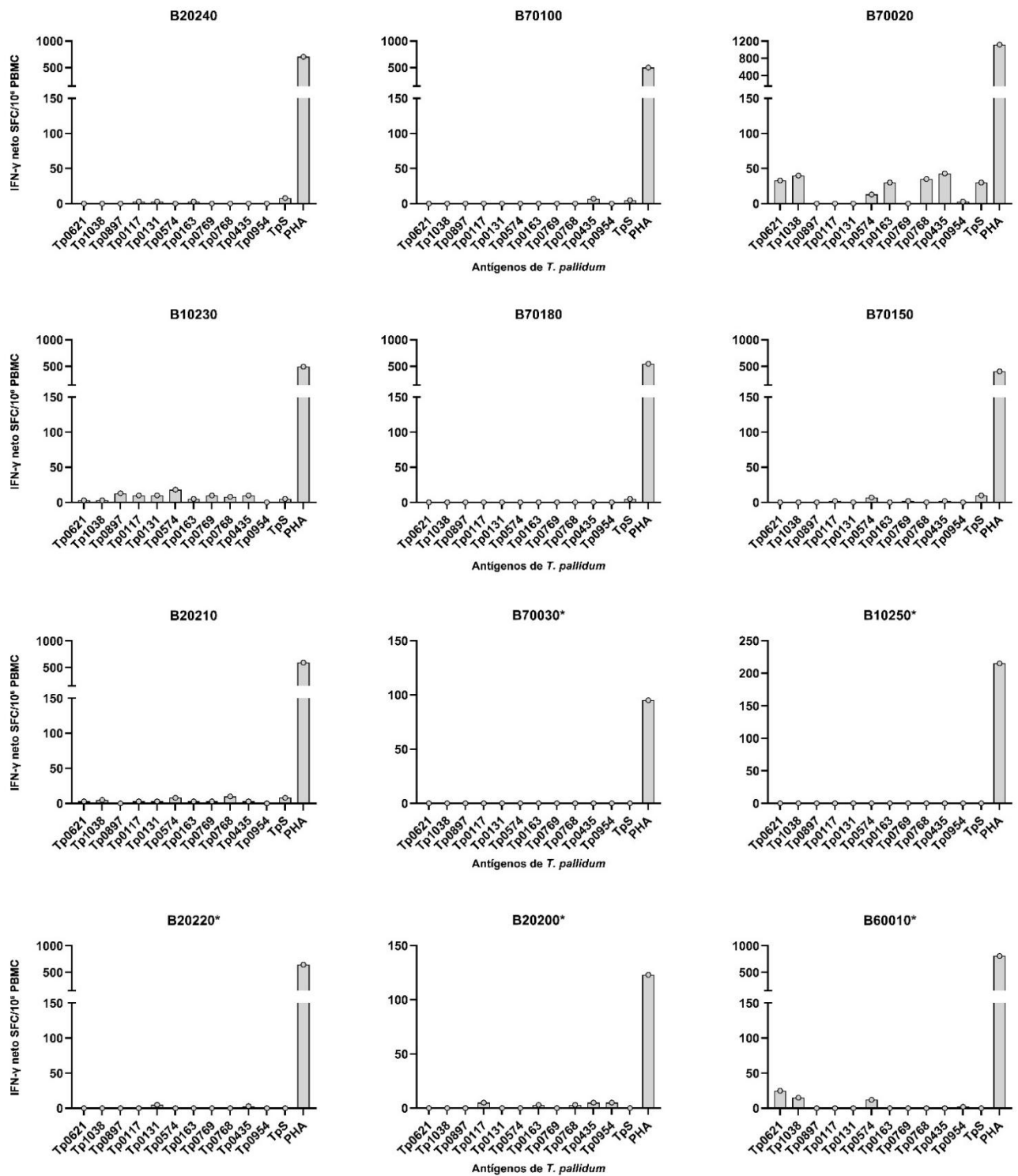
Los códigos en negrita corresponden a participantes con sífilis activa sin respuesta detectable a TpS (0 SFC/10⁶ PBMC).

Anexo 3. Perfiles individuales de producción neta de IFN- γ en sífilis activa: reinfección



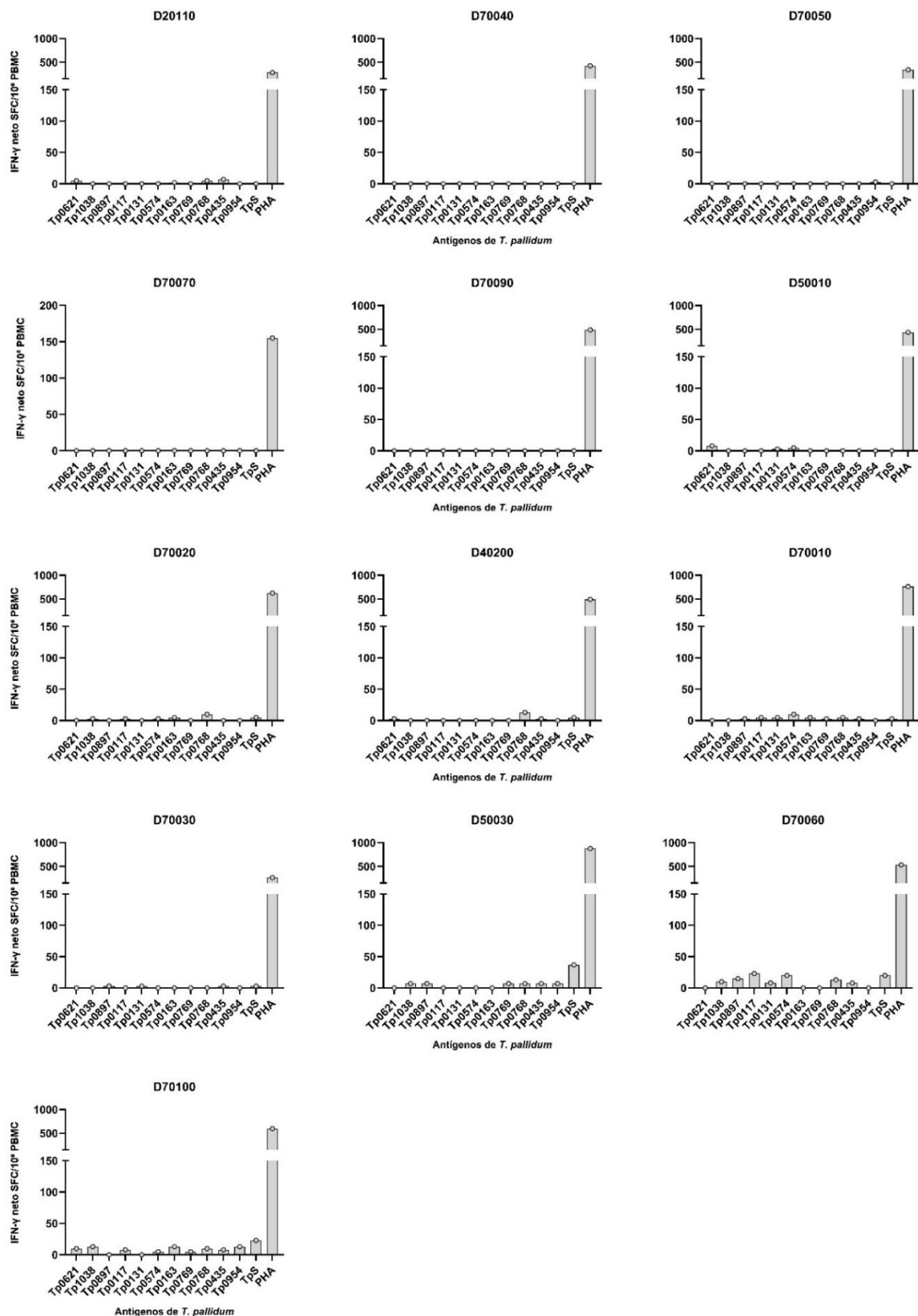
Nota: Cada panel corresponde a un participante del subgrupo de reinfección (n = 15). Las barras muestran la producción neta de IFN- γ , expresada como SFC/10⁶ PBMC, tras la corrección de fondo. Se incluyen los 11 antígenos recombinantes, TpS y PHA. (*) indica participantes sin respuesta detectable a TpS (0 SFC/10⁶ PBMC).

Anexo 4. Perfiles individuales de producción neta de IFN- γ en sífilis activa: infección *de novo*



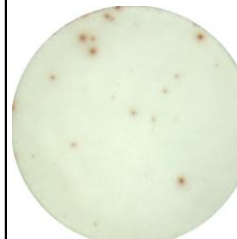
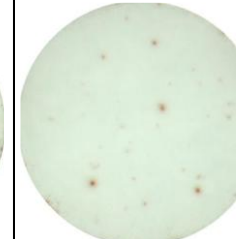
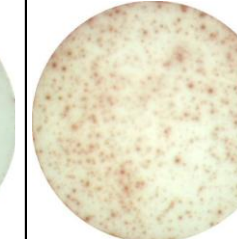
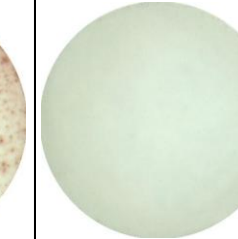
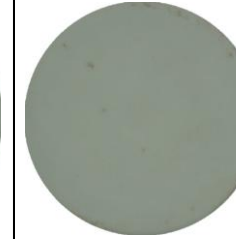
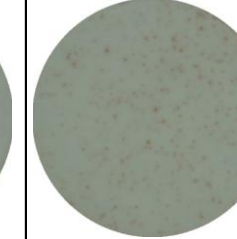
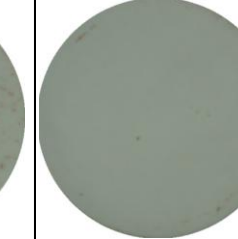
Nota: Cada panel corresponde a un participante del subgrupo de infección *de novo* ($n = 12$). Las barras muestran la producción neta de IFN- γ , expresada como SFC/10⁶ PBMC, tras la corrección de fondo. Se incluyen los 11 antígenos recombinantes, TpS y PHA. (*) indica participantes sin respuesta detectable a TpS (0 SFC/10⁶ PBMC).

Anexo 5. Perfiles individuales de producción neta de IFN- γ en sífilis negativa



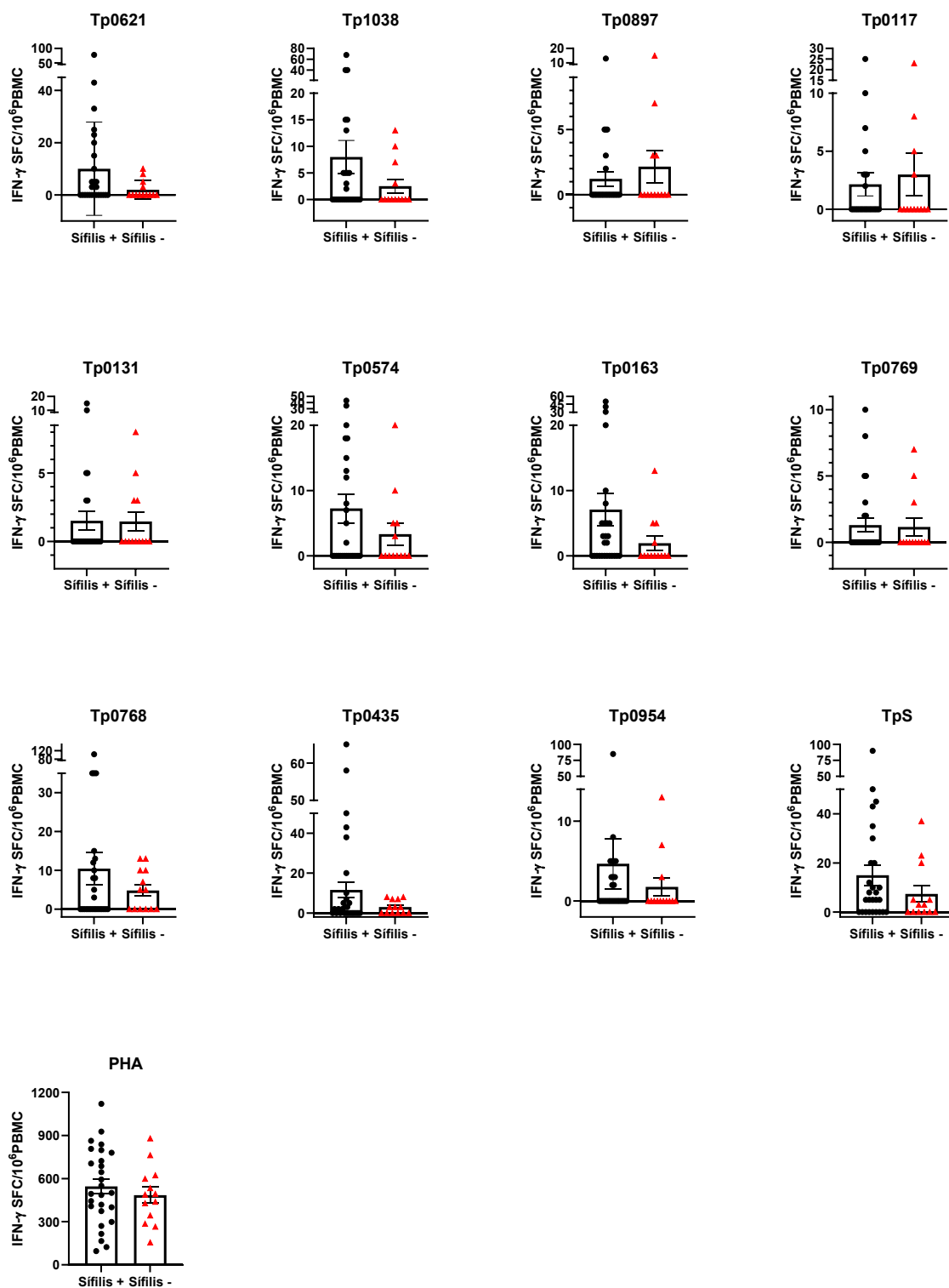
Nota: Cada panel corresponde a un participante del grupo sífilis negativa ($n = 13$). Las barras muestran la producción neta de IFN- γ , expresada como SFC/10⁶ PBMC, tras la corrección de fondo. Se incluyen los 11 antígenos recombinantes, TpS y PHA.

Anexo 6. Imágenes representativas de pocillos del ELISpot para IFN- γ frente a antígenos recombinantes seleccionados de *T. pallidum* y controles del ensayo

	Tp0621	Tp0163	Tp0435	TpS	Control positivo (PHA)	Control negativo (medio)
Sífilis activa (reinfección; código A70070)	 43 SFC/10 ⁶ PBMC	 40 SFC/10 ⁶ PBMC	 58 SFC/10 ⁶ PBMC	 43 SFC/10 ⁶ PBMC	 838 SFC/10 ⁶ PBMC	 0 SFC/10 ⁶ PBMC
Sífilis negativa (código D70040)	 0 SFC/10 ⁶ PBMC	 0 SFC/10 ⁶ PBMC	 0 SFC/10 ⁶ PBMC	 0 SFC/10 ⁶ PBMC	 428 SFC/10 ⁶ PBMC	 0 SFC/10 ⁶ PBMC
Controles de fondo cromogénico						
 (1) Medio solo 0 SFC/10 ⁶ PBMC	 (2) Sin anticuerpo de captura 0 SFC/10 ⁶ PBMC	 (3) Sin anticuerpo de detección 0 SFC/10 ⁶ PBMC	 (4) Sin conjugado enzimático 0 SFC/10 ⁶ PBMC			

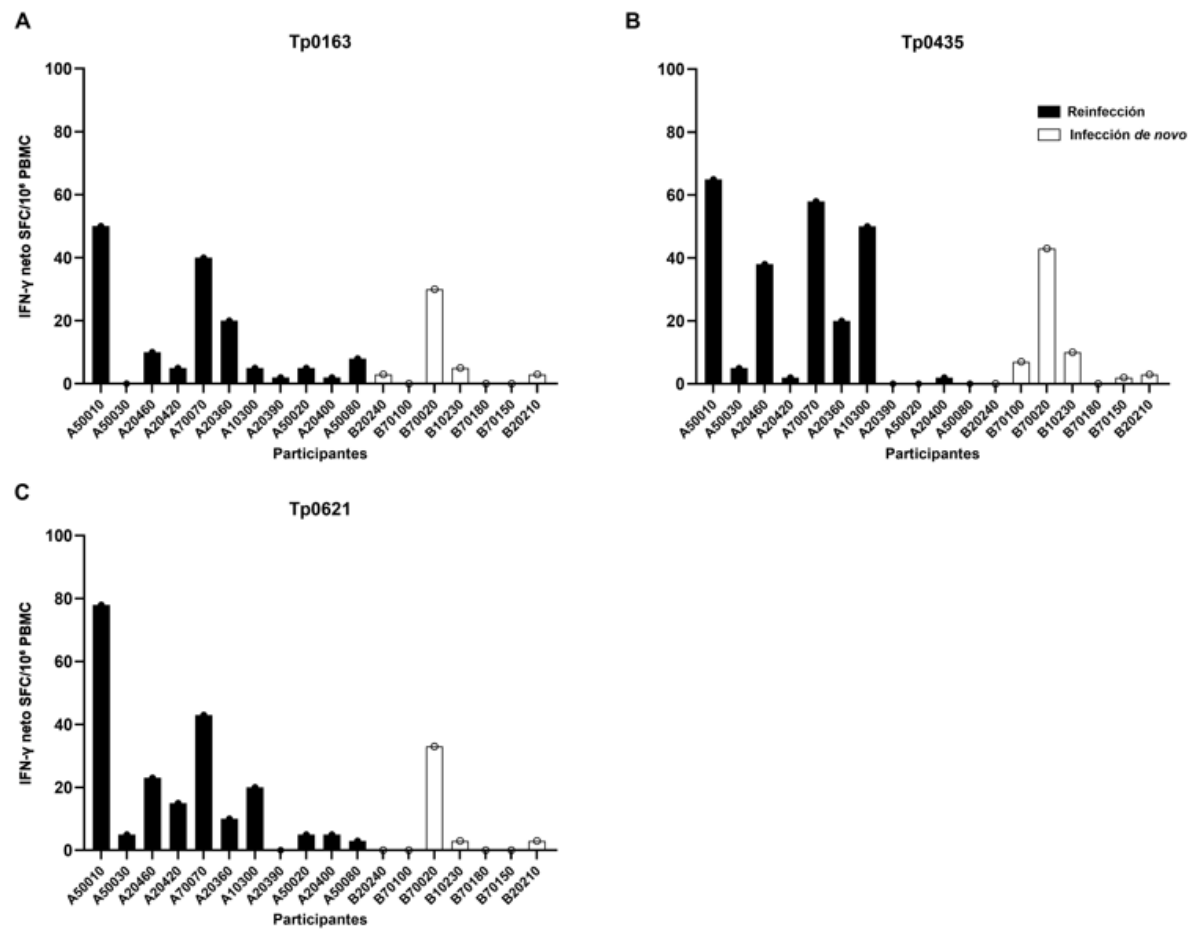
Nota: Se muestran pocillos representativos de un participante con sífilis activa (reinfección; código A70070) y de un participante con sífilis negativa (código D70040), estimulados con un subconjunto ilustrativo de antígenos recombinantes (Tp0621, Tp0163 y Tp0435) y con el sonicado de *T. pallidum* (TpS), junto con los controles del ensayo (PHA como control positivo y medio R10 sin antígeno como control negativo). Estos estímulos se presentan a modo de ejemplo para visualizar el contraste señal-fondo y la heterogeneidad observada, sin mostrar necesariamente la totalidad del panel evaluado. Los resultados se expresan como SFC/10⁶ PBMC y corresponden a valores netos tras la corrección de fondo. Además, se incluyen controles cromogénicos para verificar la ausencia de señal inespecífica asociada al revelado: (1) medio solo, (2) sin anticuerpo de captura, (3) sin anticuerpo de detección y (4) sin conjugado enzimático HRP.

Anexo 7. Comparación de la producción neta de IFN- γ entre los grupos sífilis activa y sífilis negativa



Nota: Se compararon las respuestas de IFN- γ entre los grupos sífilis activa (n = 27) y sífilis negativa (n = 13) frente a los 11 antígenos recombinantes de *T. pallidum*, así como con TpS y PHA. Los resultados se expresan como SFC/10⁶ PBMC y corresponden a valores netos tras la corrección de fondo. Cada punto representa un participante individual. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney (dos colas), considerando como significativo un valor de $p < 0.05$.

Anexo 8. Distribución individual de la producción neta de IFN- γ frente a Tp0163, Tp0435 y Tp0621 en participantes con sífilis activa respondedores a TpS



Nota: Producción neta de IFN- γ medida por ELISpot en PBMCs de participantes con sífilis activa respondedores a TpS (n = 18). Cada barra representa un participante y se diferencia por subgrupo: reinfección (barras negras; n = 11) e infección *de novo* (barras blancas; n = 7). Se muestran los antígenos con mayor frecuencia de respuesta: (A) Tp0163, (B) Tp0435 y (C) Tp0621. Los resultados se expresan como SFC/10⁶ PBMC y corresponden a valores netos tras la corrección de fondo.