

Amores-Sánchez, Isis;Gómez-Cordero, Ivonne;Baluja-Conde, Ileana;Acosta- Bas,
Carmen;Brito-Moreno, Dais;Hernández-Marín, Milenén
Evaluación de la respuesta inmune contra péptidos sintéticos representativos del
Treponema pallidum en la línea de ratones BALB/c
Bioquimia, Vol. 25, Núm. 4, octubre-diciembre, 2000, pp. 95-98
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, A.C.
México

Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=57611567001>



Bioquimia

ISSN (Versión impresa): 0185-5751

ambcli@prodigy.net.mx

Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, A.C.

México

¿Cómo citar?

Número completo

Más información del artículo

Página de la revista

Evaluación de la respuesta inmune contra péptidos sintéticos representativos del *Treponema pallidum* en la línea de ratones BALB/c.

Isis Amores-Sánchez, Ivonne Gómez –Cordero*, Ileana Baluja-Conde, Carmen Acosta- Bas, Dais Brito-Moreno y Milenén Hernández-Marín*.

Laboratorio Anticuerpos Monoclonales, Laboratorio Síntesis de Péptidos División de Inmunoquímica. Centro de Inmunoensayo. Ciudad La Habana, Cuba.

RESUMEN

La sífilis venérea es una infección contagiosa de evolución aguda y crónica. Su diagnóstico se puede realizar midiendo los niveles de anticuerpos en el suero dirigidos contra las proteínas antigénicas del agente causal *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*. En el presente trabajo se evalúa la respuesta inmune en la línea de ratones BALB/c, de tres péptidos sintéticos (F 19, F20 y F21), representativos de diferentes proteínas del *Treponema pallidum* (TimpA, TpN15 y TpN47 respectivamente), así como su reactividad en un ensayo UMELISA. Se lograron conjugar los tres péptidos con BSA a concentraciones aproximadas de 1mg/mL. Con los péptidos conjugados se inmunizaron ratones de la línea BALB/c y se observó que los títulos fueron superiores a 1/16000, por lo que pueden ser empleados como inmunógenos en la obtención de anticuerpos monoclonales. En el ensayo UMELISA los mejores resultados se obtuvieron con los péptidos sin conjugar.

Palabras claves: Sífilis, BALB/c, péptidos.

INTRODUCCIÓN

La sífilis es una infección sistémica crónica causada por el *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*¹. Se caracteriza por un periodo de incubación medio de tres semanas, seguido de una lesión primaria que se acompaña de linfadenopatía regional, una segunda etapa bacteriémica con lesiones mucocutáneas y linfadenopatía generalizada, un período latente de infección subclínica que puede durar muchos años, y aproximadamente en una tercera parte de los casos no tratados, una etapa terciaria caracterizada por lesiones mucocutáneas, músculo esqueléticas o perenquimatosas que son progresivas y destructivas, y enfermedad del sistema nervioso central¹⁻². Es considerada como una de las más importantes

Laboratorio Anticuerpos Monoclonales, * Laboratorio Síntesis de Péptidos División de Inmunoquímica. Centro de Inmunoensayo. Ciudad La Habana, Cuba.

Correspondencia: Ivonne Gómez, Laboratorio Síntesis de Péptidos, División de Inmunoquímica. Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave. 25. Ciudad La Habana, Cuba. E-mail: iqpeptidos@cie.sld.cu

ABSTRACT

Veneral syphilis is an acute, chronic and contagious disease. Diagnosis can be performed measuring antibodies levels in serum against antigenic proteins of the agent *Treponema pallidum* sp. *pallidum*. This paper is about the immune response in mice BALB/c, assessed against three synthetic peptides (F19, F20 and F21) representative of different protein of *Treponema pallidum* (TimpA, TpN15 and TpN47 respectively) so its reactivity in an UMELISA assay. Three peptides were conjugated with BSA at 1mg/mL concentration. BALB/c mice were immunized using those peptides. Titers were higher to 1/1600 with all peptides, so they can be used as immunogens to obtain monoclonal antibodies. Peptides that were not conjugated brought about best results.

Key words: Syphilis, BALB/c, peptides

enfermedades de transmisión sexual (ETS)²⁻³, de amplia distribución mundial y en estos momentos esta remergiendo en países desarrollados en vías de desarrollo mediante la transmisión heterosexual.

El diagnóstico de la Sífilis se puede realizar midiendo los niveles de anticuerpos en el suero dirigido contra las proteínas antigénicas del agente causal *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*. Sin embargo, los antígenos necesarios para los inmunoensayos y los anticuerpos contra estas proteínas son muy difíciles de obtener debido a las dificultades que tiene el cultivo “*in vitro*” de este microorganismo, ya que éstos son generalmente obtenidos de testículos de conejos infectados a un costo muy alto.

Una solución a este problema puede ser la producción de proteínas por la tecnología del ADN recombinante, así como la síntesis de péptidos representativos de las secuencias más inmunogénicas de las proteínas. Estos péptidos deben ser biológicamente activos y tienen que ser capaces de dar lugar a una respuesta inmunológica.

MATERIALES Y METODOS

Síntesis química de los péptidos

Los péptidos se sintetizaron en fase sólida, por el método descrito por Merrifield en 1963, siguiendo la estrategia Boc en bolsas de polipropileno (Biotech. Instruments, USA) ⁴. Las reacciones de acoplamiento se realizaron por activación del grupo carboxilo de cada aminoácido con cantidades equivalentes de DIPCPI 0.2 mol/L en diclorometano (DCM). La eficiencia del acoplamiento de los aminoácidos protegidos se verificó con ayuda del ensayo de ninhidrina. La eliminación de la protección temporal (Boc-), incluyendo la del NH₂-terminal, se realizó por un tratamiento con ácido trifluoroacético al 37.5% en DCM ⁴. El procedimiento empleado para la desprotección final fue el conocido como el “Low-High”, con ácido fluorhídrico (Fluka, Suiza). Posteriormente las bolsas se lavaron con éter dietílico y se secaron al vacío. Al producto final crudo se le realizó la extracción del péptido con ácido acético al 30% en H₂O destilada. El extracto final se diluyó con agua y se liofilizó, en un equipo Edwards de tecnología inglesa.

Método de conjugación

Por su tamaño, los péptidos sintéticos pueden no ser inmunogénicos por lo que se hace necesario acoplarlos a proteínas portadoras. Para la conjugación de los péptidos se utilizó el método del glutaraldehído en un solo paso ^{5,6}, como proteína portadora se empleó la seroalbúmina bovina (PM 67000 Da). La relación empleada fue de 1 mol de péptido por cada 50 aminoácidos de proteína portadora ⁵.

Esquema de inmunización

Ratones hembras de la línea BALB/c de 6 a 8 semanas fueron inmunizados con 100 µg de los péptidos F19 (TnpA), F20 (TpN15) y F21 (TpN47) y 100 µg de la proteína recombinante mezclados en coadyuvante completo de Freud por vía subcutánea.

Posteriormente se realizaron tres re-inmunizaciones a intervalos de tres semanas con igual dosis en coadyuvante incompleto de Freud por vía intraperitoneal. En cada esquema de inmunización se emplearon cuatro ratones. La reactividad de los antisueros policlonales con cada uno de los péptidos libres se evaluó mediante un ensayo ultramicroelisa.

Recubrimiento de la fase sólida

Las placas ultramicroelisa (Greiner labortechnik, Alemania) fueron recubiertas con un volumen de 15 µL/pocillo durante 18 horas a temperatura ambiente con cada péptido sintético libre y conjugado y con la proteína recombinante por separado a concentraciones entre 0.5 y 12 µg/mL en una disolución reguladora carbonato-bicarbonato, 0,05 mol/L; pH 9.6. La fase sólida se lavó con una disolución amortiguadora de PBS-T (8 g de NaCl; 1.215 g de Na₂HPO₄ • 2H₂O; 0.2 g de KH₂PO₄; 0.2 g de NaN₃; 0.5 mL de Tween-20; en 1 000 mL de agua destilada, pH 7.3) y posteriormente se bloqueó con una disolución de preservó

(sacarosa al 5% y BSA al 1% en PBS-Tween), durante 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C). Se aspiró la disolución de preservó y la fase sólida se dejó secar a 37°C durante 2 h. Las placas recubiertas se conservaron a 4°C, en una cubierta protectora, hasta el momento de su uso.

Evaluación de la inmunogenicidad

Para la evaluación de la inmunogenicidad se realizó una extracción de suero a los ratones inmunizados con los péptidos y la proteína recombinante, 78 días después de la primera inmunización. Los antisueros se evaluaron en placas previamente tituladas (0.5 µg/mL) con los péptidos correspondientes y la proteína recombinante. Las muestras evaluadas fueron diluidas desde 1/100 hasta 1/128000 en suero de carnero al 5% en una disolución amortiguadora Tris-HCl. Como conjugado se empleó anti-IgG de ratón unida con fosfatasa alcalina ⁵ a una dilución de 1:2000 (Laboratorio Purificaciones, Centro de Inmunoensayo) y para el revelado de la reacción se adicionó el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferilfosfato.

Evaluación de la antigenicidad

Para la evaluación de la antigenicidad se recubrieron placas con TmpA recombinante a cinco concentraciones diferentes, 0.5, 4, 8, 10, 12 µg/mL. En estas placas se evaluó el antisuero anti-péptido F19, diluido desde 1/1000 hasta 1/128000. Como control se empleó suero normal de ratón.

Ensayo ultramicroelisa (UMELISA)

Las muestras a evaluar se diluyeron 1:20 en suero de carnero al 5% en una disolución amortiguadora TrisHCl (15 mmol/L de Tris; pH 7.8 y 0.05% Tween-20) y se incubaron 30 min a 37°C en las placas de reacción. Después de lavar tres veces con la disolución amortiguadora Tris-HCl, con el objetivo de eliminar los componentes no fijados, se adicionó un conjugado anti-IgG humana en carnero marcada con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania) ⁶, y se incubó nuevamente durante 30 min a 37°C. Se realizó un nuevo lavado en las mismas condiciones, para eliminar el conjugado en exceso. Se añadió entonces el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferilfosfato (Koch Light Ltd. Haverhill, Suffolk, England), y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente ⁷. La fluorescencia emitida fue medida en un fluorímetro de la serie SUMA[®] (PR-521, Centro de Inmunoensayo) (excitación a 365 nm y emisión a 450 nm). En todos los experimentos, se incluyeron controles positivos y negativos, los ensayos se realizaron por cuadruplicado y las muestras se analizaron por duplicado.

Muestras

Se analizaron 21 muestras; 17 muestras positivas (por “Venereal Disease Research Laboratories” y confirmadas por “Fluorescence Treponema Antibody”) y cuatro muestras negativas de recién nacidos, procedentes del Instituto de Higiene y Epidemiología de Marianao y Hospital Materno “Ramón González Coro” respectivamente.

RESULTADOS

Síntesis de péptidos

Fueron sintetizados tres péptidos: F19, F20 y F21 representativos de los sitios antigénicos de tres proteínas de membranas TmpA, TpN15 y TpN47 respectivamente ¹⁰. En la tabla I se muestran los resultados de la síntesis.

Los péptidos sintéticos obtenidos están involucrados en la respuesta de anticuerpos al *Treponema pallidum*.

Resultados de la conjugación

Los péptidos obtenidos se conjugaron entonces por el método del glutaraldehído, los resultados se muestran en la tabla II. Como se puede observar las concentraciones de los péptidos osciló entre 0.98 y 1.05 mg/mL.

Evaluación de la inmunogenicidad

La evaluación del título de los antisueros anti-péptidos y anti-proteína recombinante se realizó en un ensayo ultramicroelisa, que resultó efectivo para la evaluación de la reactividad de los sueros de los ratones respecto a los péptidos sintéticos y la proteína recombinante. Las placas fueron recubiertas con los péptidos y la proteína recombinante correspondiente a cada esquema de inmunización. Los resultados de los títulos obtenidos se muestran en la tabla III. Todos los péptidos analizados de la línea de ratones BALB/c tuvieron buena respuesta, no existiendo restricción por el HLA de estos ratones ¹¹.

Evaluación de la antigenicidad

La concentración óptima de las placas recubiertas con TmpA recombinante fue 0.5 µg/mL. En ellas se pusieron a reaccionar los antisueros F19-BSA y TmpA recombinante diluidos 1/1000 y 1/128000, los resultados se muestran en el Gráfico 1.

En el gráfico 1 se observa un reconocimiento por parte de los sueros de los ratones a 0.5 µg/mL de recubrimiento, para ambos antisueros. En un ensayo previo, recubriendo a concentraciones de 2, 4, 8, 10 y 12 µg/mL se observó una disminución de la fluorescencia, que pudiera ser por un efecto gancho, por lo que se recomienda trabajar a 0.5 µg/mL.

Resultados obtenidos en el ensayo ultramicroelisa

Los mejores resultados de recubrimiento se obtuvieron a 0.5 µg/mL, tanto para los péptidos libres como conjugados. A esta concentración se analizaron las 21 muestras, los resultados se muestran en el gráfico 2. Como positivas se consideraron las muestras cuyos resultados fueron superiores a 30 unidades de fluorescencia.

Las 17 muestras reportadas como positivas lo fueron frente al péptido sintético libre y conjugado representativo de la región

TmpA y para los péptidos F20-BSA y F21-BSA, pero no para esos péptidos libres (F20 y F21), esto puede deberse a que esas muestras no reconocen esas regiones. En todos los péptidos se observó un aumento considerable en los valores de fluorescencia al conjugarlos. La conjugación de los péptidos afectó la detección de las muestras negativas, ya que aumentó igualmente su fluorescencia, por lo que se detectaron dos muestras como falsas positivas, al emplear los péptidos F19-BSA y F21-BSA.

Según los resultados podemos concluir que los péptidos sintéticos pueden ser empleados como inmunógenos para la obtención de anticuerpos monoclonales en la línea de ratones BALB/c, aunque no deben ser empleados en su forma conjugada en el ensayo UMELISA.

TABLA 1

Resultados de la síntesis de péptidos

Péptidos sintéticos	Peso Molecular	# de aminoácidos
F19 (TmpA)	1999.5	19
F20 (TpN15)	1470.73	13
F21 (TpN47)	2287.82	20

TABLA 2

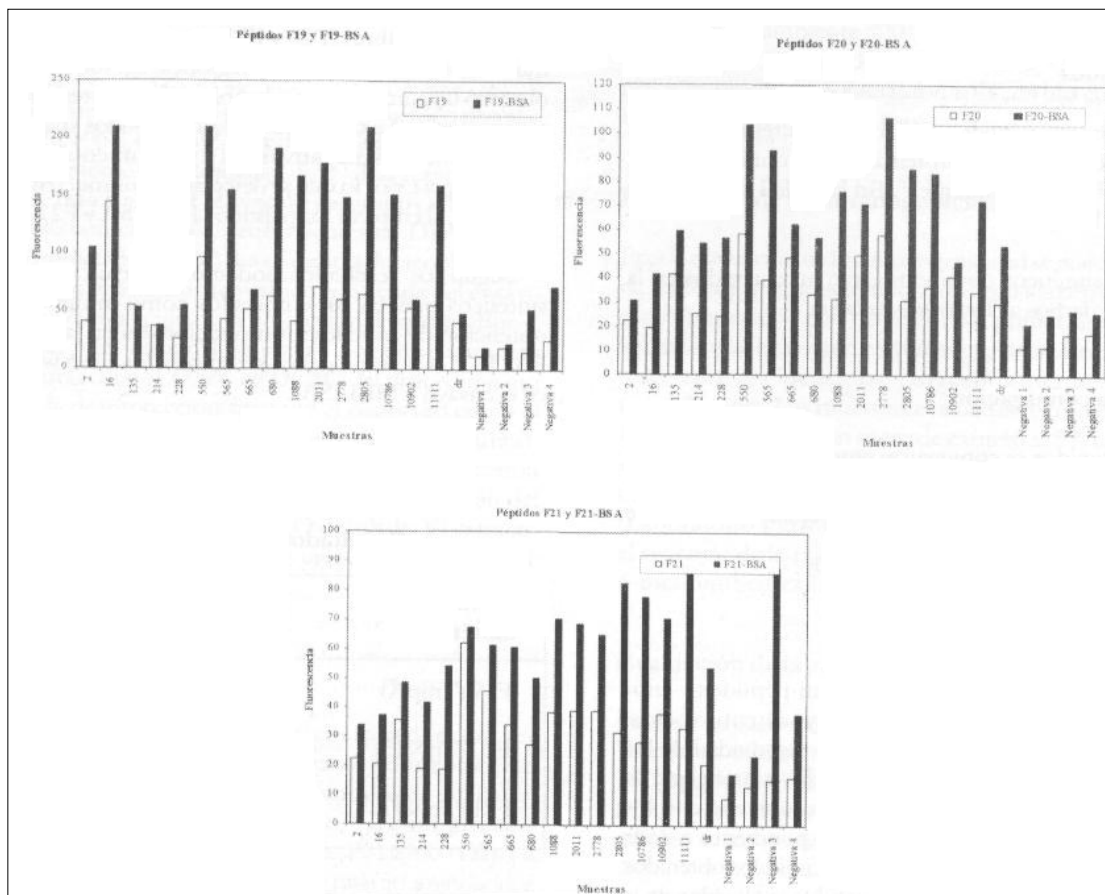
Resultados de los péptidos conjugados

Péptidos sintéticos conjugados	Concentración	Volumen
F19-BSA	1.05 mg/mL	4mL
F20-BSA	0.98 mg/mL	4mL
F21-BSA	1.05 mg/mL	4mL

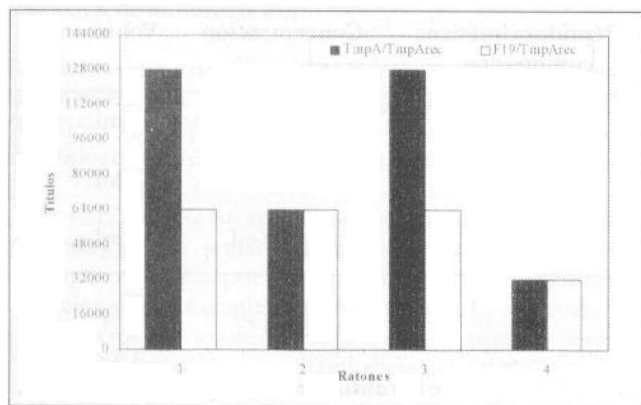
TABLA 3

Título de los antisueros anti-péptidos y anti-proteína recombinante

	F19	F20	F21	TmpA Recombinante
Ratón 1	1:64000	1:32000	1:64000	>1:128000
Ratón 2	1:32000	1:128000	1:64000	1:64000
Ratón 3	1:32000	1:32000	1:128000	1:128000
Ratón 4	1:16000	1:64000	1:32000	1:32000



Gráfica 2. Resultados de las muestras frente a los péptidos sintéticos libres (F19, F20, F21) y conjugados (F19-BSA, F20-BSA, F21-BSA).



Gráfica 1. Resultados del péptido F19 frente a la proteína recombinante de la TmpA (como control se emplearon los resultados del antisuero de la proteína recombinante).

BIBLIOGRAFIA

- Norris SJ and the *Treponema pallidum* polypeptide research group. Polypeptides of *Treponema pallidum*. progress toward understanding their structural, functional and immunologic roles. Microbiological reviews 1993; 57(3): 750.
- World Health Organization. HIV/AIDS and sexually transmitted diseases, WHO policy and strategic orientations. Report WHO/ASD/96.2 World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1996.
- Ebel A, Bachelart L, Alonso JM. Evaluation of a new competitive Immunoassay (BioElisa Syphilis) for screening for *Treponema pallidum* antibodies at various stage of syphilis. J Clin Microb 1998; 36 (2): 358-361.
- Merrifield RB. Peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J Am Chem Soc 1963; 85, 2149.
- Harlow E, Lane D. Chapter 5 Coupling peptides to carriers proteins. In: Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory 1988; 78-87.
- Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Capítulo 11 Preparation of enzyme-antibody of other enzyme macromolecule conjugates. Vol. 15, Edit. R.H. Burdon and P.H. Van Knippenberg, Elsevier science publishers B V 1985; 221-246.
- Gómez I, Cazanave J, Solís RL, Machado C, Bécquer D, Fernández JL. A new UMELISA format for the quantification of maternal serum alpha-fetoprotein. Biotecnología Aplicada 1996; 109.
- Antoni G, del Maso G, Berti B, Soldatini C, Cocola F. Detection of antigenic determinants in *Treponema pallidum* membrane protein TmpA using overlapping synthetic peptides. J Immunol Methods 1996; 189 (1):137-140.
- Baughn RE. Epitope mapping of B-cell determinants of the 15 kilodalton. Lipoprotein of *T. pallidum* (Ipp15) with synthetic peptides. Infection and Immunity V 1996; 64: 2457-2466.
- Baughn RE, Jiang A, Abraham R, Ottmers V, Musher DM. Molecular mimicry between an immunodominant amino acid motif of the 47 kDa lipoprotein of *Treponema pallidum* (Tpp47) and multiple repeats of analogous sequences in fibronectin. J Immunol 1996; 157 (2): 720-731.
- Lyon, S. Rastan and S.D.M. Brown. H2 complex, histocompatibility-2. In: Genetic variants and strains of the Laboratory Mouse. Ed. M.F. Thrid edition V.2 chapter 17. Oxford University Press Inc., New York 1996; 321-324.