



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÍVEL DOUTORADO

LARA CÂNDIDA DE SOUSA MACHADO

DESENVOLVIMENTO DE UM SORODIAGNÓSTICO PARA SÍFILIS A
PARTIR DE EPÍTOPOS DE PROTEÍNAS DA *Treponema pallidum*

CRICIÚMA

2025

LARA CÂNDIDA DE SOUSA MACHADO

**DESENVOLVIMENTO DE UM SORODIAGNÓSTICO PARA SÍFILIS A
PARTIR DE EPÍTOPOS DE PROTEÍNAS DA *Treponema pallidum***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila

CRICIÚMA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M149d Machado, Lara Cândida de Sousa.

Desenvolvimento de um sorodiagnóstico para sífilis a partir de epítomos de proteínas da *Treponema pallidum* / Lara Cândida de Sousa Machado. - 2025.

88 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2025.

Orientação: Ricardo Andrez Machado de Ávila.

1. Sorodiagnóstico. 2. Sífilis - Sorodiagnóstico. 3. Peptídeos. 4. Epítomos imunodominantes. I. Título.

CDD 23. ed. 616.0756

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

PARECER


No dia 13 (treze) do mês de março de 2025, às 13 (treze) horas, na Sala 108/Bloco R1, após o cumprimento legal de conclusão das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado), realizaram-se a apresentação e a consequente defesa da tese intitulada: **“DESENVOLVIMENTO DE UM SORODIAGNÓSTICO PARA SÍFILIS A PARTIR DE EPÍTOPOS DE PROTEÍNAS DA *TREPONEMA PALLIDUM*”**, da candidata **Lara Cândida de Sousa Machado**. A Banca examinadora foi composta pelos(as) professores(as): **Dra. Cinara Ludvig Gonçalves** (Membro Relator – UNESC), **Dra. Josiane Budni** (Membro Interno – UNESC), **Dr. Antônio Augusto Schäfer** (Membro Externo – UNESC) e **Dra. Stephanie Stransky Láuar** (Membro Externo – Albert Einstein College of Medicine). Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora, que assim expressou o resultado final da tese:

Trabalho aprovado


Trabalho não aprovado

Observações:


Criciúma, SC, 13 de março de 2025.

Documento assinado digitalmente
 **CINARA LUDVIG GONÇALVES**
Data: 21/03/2025 12:31:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dra. CINARA LUDVIG GONÇALVES
Membro Relator – UNESC

Documento assinado digitalmente
 **JOSIANE BUDNI**
Data: 27/03/2025 13:46:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dra. JOSIANE BUDNI
Membro Interno – UNESC

Documento assinado digitalmente
 **ANTONIO AUGUSTO SCHAFER**
Data: 21/03/2025 13:21:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. ANTÔNIO AUGUSTO SCHÄFER
Membro Externo – UNESC

Documento assinado digitalmente
 **STEPHANIE STRANSKY LAUAR**
Data: 24/03/2025 10:30:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. STEPHANIE STRANSKY LÁUAR
Membro Externo – Albert Einstein College of Medicine

Documento assinado digitalmente
 **RICARDO ANDREZ MACHADO DE AVILA**
Data: 21/03/2025 12:11:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. RICARDO ANDREZ MACHADO DE ÁVILA
Orientador(a)

Documento assinado digitalmente
 **SAMIRA DA SILVA VALVASSORI**
Data: 02/04/2025 09:15:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. SAMIRA DA SILVA VALVASSORI
Coordenadora Adjunta do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNESC.

À Deus, pela fé, força, tolerância e proteção total da minha vida
À minha mãe, pelo incentivo e amor incondicional
Ao meu esposo e meus filhos, pelo apoio e estímulos nas horas de desistência, pelas horas
não dedicadas e suas por direito.

AGRADECIMENTOS

Meu profundo agradecimento ao Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila, mesmo sem vagas de orientação abriu uma exceção e aceitou me orientar, são coisas divinas que não acontecem por acaso e sim porque nossos caminhos deveriam se cruzar, pois eu precisaria de um “paizão” como ele foi, precisava das palavras e dos acalantos em momentos de ansiedade (que não foram poucos), ajudando-me a refinar meu pensamento crítico e a desenvolver esta pesquisa. A vontade de desistir foi grande, mas seus conselhos e dicas foram, sem dúvida, essenciais para o meu crescimento acadêmico. Obrigado pela paciência e credibilidade. Até breve!

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Rahisa Scussel pela oportunidade do desenvolvimento dessa pesquisa, pela competência, pelo imenso apoio, pela dedicação, humildade e até pelos sorrisos. A pesquisa não seria a mesma sem a sua presença.

Agradeço a Letícia Alves Borghezan pela atenção disponibilizada, por sua competência, compromisso no desenvolvimento dessa pesquisa, pelo apoio, dedicação e paciência.

Agradeço à minha amiga Ana Paula Fontana, por estar sempre disposta a ouvir minhas angústias e por me incentivarem nos momentos difíceis. Sua amizade e apoio foram, com certeza, fundamentais durante esse processo.

Agradeço a todos os colegas do laboratório de Fisiopatologia Experimental, em especial ao grupo de pesquisa em Biotecnologia: Dra. Mírian, Mariana, Ellen, Jéssica, Duda, Nicolý, Luana, Lidiane, Lariani, Gabriel, Érica, Flávia e Rafaela. Agradeço aos colegas do Dinter/UniRV em especial a Dr.^a Cinthia Cardoso e Dr. ° Victor Freire que fizeram parte da minha trajetória na UNESC.

Estendo meus agradecimentos aos professores do Dinter/UniRV/UNESC, os quais tive a inestimável oportunidade de conhecer e aprender com cada um deles. Muito obrigada professor Dr. Paulo Cesar Lock Silveira, professor Dr. Eduardo Rico, professora Dra. Flávia Rigo, professor Dr. Emílio Luiz Streck, professora Dra. Cinara Ludvig Gonçalves, professora Dra. Maria Inês da Rosa, professora Dra. Gislaine Zilli Réus e professora Dra. Jaqueline da Silva Generoso. Estendo também agradecimentos à secretária Samiris pela educação e atenção dedicada a nós acadêmicos.

Agradeço aos coordenadores do PPGCS, professor Emílio e professor Ricardo, pelo trabalho que realizaram à frente do programa de pós-graduação. Desta forma desdobro meus

agradecimentos a todos os professores do PPCGS pela qualidade de ensino nas disciplinas que cursei no doutorado.

Agradeço as instituições que por meio de seus pesquisadores, funcionários e infraestrutura fomentaram a viabilidade deste trabalho: Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e pelo grande incentivo e apoio da minha instituição de origem Universidade de Rio Verde – Goiás (UniRV).

“A tradição não é a adoração das cinzas, mas a preservação do fogo.”

— Gustav Mahler.

RESUMO

A sífilis é uma infecção sexualmente transmissível bacteriana tendo como agente etiológico a *Treponema pallidum*. Atualmente é um problema de saúde pública, sendo que em certas regiões do mundo a prevalência tem aumentado significativamente. Em 2023, o Brasil registrou 242.826 casos de sífilis adquirida, com uma taxa de detecção de 113,8 casos por 100.000 habitantes. Apesar dos avanços na prevenção e no tratamento, a falta de diagnóstico precoce e a continuidade do tratamento ainda são barreiras significativas. A sífilis apresenta quatro estágios, sendo eles, o primário, secundário, latente e terciário ou também chamado de forma tardia. O diagnóstico é bastante complexo, realizado com base na história clínica, exame físico, semiologia e testes laboratoriais complementares, os quais consistem nos testes treponêmicos e não treponêmicos. Contudo, os atuais exames laboratoriais confirmatórios são muitas vezes ineficazes, gerando falso-resultados bem como levando a imprecisão do diagnóstico das fases da sífilis. Neste contexto, este trabalho propôs o desenvolvimento de uma plataforma de teste sorológico, ultrasensível, baseado em peptídeos de epítomos específicos provenientes de proteínas imuno dominantes altamente antigênicas e imunogênicas. Os participantes foram amostrados por meio de um estudo transversal. Assim, o perfil epidemiológico dos participantes foi determinado. O estudo transversal de acurácia diagnóstica foi executado avaliando a acurácia, sensibilidade, especificidade e valores preditivos do teste índice como uma ferramenta de vigilância para exposição à sífilis. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade de Rio Verde – Goiás/UNIRV sob o número de protocolo CAAE: 59241322.0.0000.5077. Os epítomos das cinco proteínas de antígenos imunodominantes Tp0171 (Tp15), Tp0435 (Tp17), Tp0574 (Tp47), Tp0684 e Tp0453 foram desenhados por ferramentas de bioinformática e peptídeos miméticos destes epítomos foram sintetizados quimicamente. Foram utilizados cinco peptídeos como antígenos em ELISA contra amostras de soro de sífilis positiva ou não infetados (n=84). Após, os peptídeos de melhor performance diagnóstica foram utilizados para monitorizar a eficácia do tratamento da sífilis (n=122). Entre os peptídeos avaliados para o diagnóstico, o CETp0435 apresentou um desempenho de diagnóstico superior, alcançando 100% de sensibilidade e especificidade com elevada acurácia. Os peptídeos CETp0171 e CETp0574 demonstraram um elevado desempenho de diagnóstico, com sensibilidade superior a 83% e especificidade superior a 90%. Os peptídeos CETp0684 e CETp0453 apresentaram uma sensibilidade superior a 80% e 90%, respectivamente, no entanto, o CETp0453 apresentou uma especificidade reduzida (~66%). Os peptídeos CETp0435 e CETp0171 demonstraram uma elevada acurácia de diagnóstico em todos os estágios da sífilis, com uma sensibilidade superior a 83% e uma especificidade superior a 97%. O CETp0435 alcançou 100% de sensibilidade e especificidade nos estágios primário, secundário e latente, enquanto o CETp0171 demonstrou um excelente desempenho na sífilis secundária e elevada acurácia nos estágios primário e latente. Após, os peptídeos CETp0435 e CETp0171 foram efetivos no monitoramento da eficácia do tratamento da sífilis, como evidenciado pelo declínio significativo dos níveis de anticorpos nos soros após o tratamento, apoiando o seu potencial como biomarcadores para avaliar a eficácia terapêutica. Ao final deste estudo obteve-se dois peptídeos, CETp0435 e CETp0171, como antígenos vantajosos para o sorodiagnóstico e o monitoramento do tratamento. A predição de epítomos via bioinformática permitiu o desenvolvimento de plataformas ELISA que oferecem ferramentas promissoras para uma melhor detecção da sífilis além de alternativa de teste treponêmico no monitoramento da abordagem terapêutica para sífilis, atualmente avaliada somente por testes não treponêmicos.

Palavras-chaves: Sífilis; estudo de acurácia; sorodiagnóstico; peptídeo sintético; antígenos imunodominantes.

ABSTRACT

Syphilis is a bacterial sexually transmitted infection (STI) caused by *Treponema pallidum*. It remains a significant public health concern, with prevalence increasing in certain regions worldwide. In 2023, Brazil recorded 242,826 cases of acquired syphilis, with a detection rate of 113.8 cases per 100,000 inhabitants. Despite advances in prevention and treatment, the lack of early diagnosis and adherence to treatment remain major barriers. Syphilis progresses through four stages: primary, secondary, latent, and tertiary (also referred to as late-stage syphilis). Diagnosis is highly complex and relies on clinical history, physical examination, serology, and complementary laboratory tests, which include treponemal and non-treponemal assays. However, current confirmatory laboratory tests often exhibit limitations, leading to false results and impairing the accurate staging of syphilis. In this context, this study aimed to develop an ultra-sensitive serological testing platform based on specific epitope-derived peptides from immunodominant proteins involved in the invasion of host cells and/or highly expressed during the replication stages of the syphilis-causing bacterium. These proteins are highly antigenic and immunogenic. Participants were enrolled in a cross-sectional study and categorized into flowcharts using a diagrammatic approach. The epidemiological profile of the participants was determined, and a diagnostic accuracy study assessed the sensitivity, specificity, predictive values, and overall accuracy of the index test as a surveillance tool for syphilis exposure. This study was approved by the Research Ethics Committee for Human Studies at the University of Rio Verde – Goiás/UNIRV under protocol number CAAE: 59241322.0.0000.5077. The epitopes of five immunodominant antigenic proteins—Tp0171 (Tp15), Tp0435 (Tp17), Tp0574 (Tp47), Tp0684, and Tp0453—were designed using bioinformatics tools, and mimetic peptides of these epitopes were chemically synthesized. Five peptides were used as antigens in an ELISA assay against serum samples from individuals with syphilis or uninfected individuals (n=84). Subsequently, the peptides with the best diagnostic performance were used to monitor the efficacy of syphilis treatment (n=122). Among the peptides evaluated for diagnosis, CETp0435 exhibited superior diagnostic performance, achieving 100% sensitivity and specificity with high accuracy. The peptides CETp0171 and CETp0574 demonstrated strong diagnostic performance, with sensitivity exceeding 83% and specificity above 90%. The peptides CETp0684 and CETp0453 showed sensitivities above 80% and 90%, respectively; however, CETp0453 exhibited reduced specificity (~66%). CETp0435 and CETp0171 demonstrated high diagnostic accuracy across all syphilis stages, with sensitivity above 83% and specificity exceeding 97%. CETp0435 achieved 100% sensitivity and specificity in primary, secondary, and latent stages, whereas CETp0171 demonstrated excellent performance in secondary syphilis and high accuracy in primary and latent stages. Furthermore, CETp0435 and CETp0171 were effective in monitoring syphilis treatment efficacy, as evidenced by a significant decline in antibody levels in serum samples post-treatment, supporting their potential as biomarkers for therapeutic efficacy assessment. As a result, two peptides, CETp0435 and CETp0171, were identified as advantageous antigens for serodiagnosis and treatment monitoring. Epitope prediction using bioinformatics enabled the development of ELISA platforms that provide promising tools for improved syphilis detection and offer an alternative treponemal test for monitoring therapeutic approaches to syphilis, which is currently assessed exclusively through non-treponemal tests.

Keywords: Syphilis; accuracy study; serodiagnosis; synthetic peptide; immunodominant antigens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração da arquitetura da membrana externa da <i>T. pallidum</i>	21
Figura 2 - Algoritmo adotado para o rastreamento da sífilis no CTA de Rio Verde/GO – Brasil.	36
Figura 3 - Gráfico QQ Normal (Quantil-Quantil) de dados da vigilância da eficácia do tratamento da sífilis.	40
Figura 4 - Epítomos conformacionais em proteínas <i>T. pallidum</i> em estruturas 3D.	39
Figura 5- Reatividade sorológica utilizando peptídeos sintéticos como antígeno para o sorodiagnóstico da sífilis e respectiva curva ROC.	45
Figura 6 - Painel sorológico do estágio da sífilis utilizando o peptídeo CETp0171 como antígeno e suas respectivas curvas ROC.	47
Figura 7 - Painel sorológico do estágio da sífilis utilizando o peptídeo CETp0435 como antígeno e respectivas curvas ROC.	48
Figura 8 - Painel sorológico do estágio da sífilis utilizando o peptídeo CETp0574 como antígeno e respectivas curvas ROC.	49
Figura 9 - Painel sorológico do estágio da sífilis utilizando o peptídeo CETp0684 como antígeno e respectivas curvas ROC.	50
Figura 10 - Painel sorológico do estágio da sífilis utilizando o peptídeo CETp0453 como antigênico e respectivas curvas ROC.	51
Figura 11- Monitoramento da eficácia da abordagem terapêutica da sífilis utilizando os níveis de anticorpos contra o CETp0171 (A) e o CETp0435 (B) ao longo das fases de tratamento. .	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. EVOLUÇÃO EPIDEMIOLÓGICA	14
1.2. AGENTE ETIOLÓGICO: <i>Treponema pallidum</i>	16
1.3. PATOGÊNESE E IMUNOPROTEÔMICA DA <i>Treponema pallidum</i>	18
1.4. DIAGNÓSTICO	25
1.4.1. Testes não treponêmicos.....	29
1.4.2. Testes treponêmicos	30
2. OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 DESENHO DO ESTUDO	34
3.2 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO	34
3.2.1 Aprovações éticas.....	34
3.2.2 Critério de inclusão.....	35
3.2.4 Coleta de amostras e algoritmo diagnóstico de sífilis	35
3.3 DESING DA PLATAFORMA DE SORODIAGNÓSTICO DE SÍFILIS	36
3.3.1 Análises de bioinformática.....	36
3.4 ELISA BASEADO EM PEPTÍDEOS	38
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	39
4. RESULTADOS	40
4.2 VALIDAÇÃO DA PLATAFORMA DE SORODIAGNÓSTICO PARA SÍFILIS	41
4.2.1 Epítipo conformacional de antígenos proteicos treponêmicos	41
4.2.2 Validação do sorodiagnóstico utilizando peptídeos miméticos.....	43
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICE(S)	80
APÊNDICE A – PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS	81
ANEXO(S).....	82
ANEXO A – APROVAÇÃO DO CEP	83

1. INTRODUÇÃO

A sífilis é uma infecção sexualmente transmissível (IST) causada pela bactéria *Treponema pallidum*, considerado um agravo de notificação compulsória, caracteriza-se por múltiplos estágios clínicos e longos períodos de latência. Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento, a sífilis continua sendo um problema de saúde pública global, com um aumento significativo de casos nos últimos anos (WHO, 2024). A doença pode causar complicações graves se não tratada, afetando diversos sistemas do corpo humano, incluindo o sistema nervoso central e cardiovascular (Santacroce et al, 2020; Freitas et al, 2020).

Historicamente, a origem da sífilis é controversa. Duas teorias principais competem para explicar seu surgimento: a teoria colombiana, que sugere que a doença foi trazida para a Europa pelos marinheiros de Cristóvão Colombo após o retorno das Américas, e a teoria pré-colombiana, que argumenta que a sífilis já existia na Europa antes das viagens de Colombo (Tampa et al, 2014; Braga et al, 2021). Independentemente de sua origem, a sífilis rapidamente se espalhou pela Europa no final do século XV e início do século XVI, causando uma pandemia significativa. Desde então, o desenvolvimento de testes diagnósticos mais precisos e tratamentos eficazes, como a penicilina, transformou significativamente o manejo da doença. No entanto, desafios persistem, incluindo o aumento da resistência aos antibióticos e a necessidade de estratégias de prevenção mais eficazes (Maia et al, 2023).

1.1. EVOLUÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

De acordo com historiadores a sífilis foi encontrada nos estudos de esqueletos datados de cem anos, antes de 1492, nas Américas. Essa doença assolou diversos países e populações, tendo incontáveis casos e mortes decorrentes das suas complicações (Passos et al, 2021). Há relatos que os números de casos dessa doença aumentaram após a volta dos soldados da segunda guerra mundial, contudo, com a descoberta da penicilina, a doença se estabilizou, diminuindo o número de casos. Entretanto, com a revolução sexual em meados de 1960, a doença começou a assolar a população (Peeling et al, 2017).

Apesar da disponibilidade de terapia antibiótica barata e eficaz, a sífilis continua sendo uma doença prevalente nos países em desenvolvimento e ressurgiu como uma ameaça à saúde pública nos países desenvolvidos (*European Center for Disease Prevention and Control: Syphilis*, 2024; Komori et al, 2024). Durante os anos 2000 houve um declínio significativo nos casos de sífilis em países desenvolvidos, sendo as taxas bem menores que em 1941, levando

muitos pesquisadores a acreditarem que a doença poderia ser erradicada. Contudo, após alguns anos de baixa incidência, infelizmente em 2001 a 2005 os números voltaram a aumentar, chegando em 2004 a 2005 a uma alta de cerca de 11% desde 1990 (Puccio et al, 2019).

Segundo o *European Center for Disease Prevention and Control: Syphilis* (2024) descreveu em seu relatório epidemiológico anual que entre 2013–2022, foram notificados cerca de 250.000 casos de sífilis no cenário europeu. O número de notificações anuais aumentou continuamente entre 2013 e 2019 e diminuiu em 2020. A diminuição em 2020 esteve associada a o impacto da pandemia da COVID-19 na disponibilidade e/ou acesso aos serviços de cuidados de IST, redução das oportunidades de testagem e diminuição da capacidade de vigilância das IST devido ao desvio de recursos para a resposta à COVID-19.

Com o surgimento da pandemia da COVID-19, houve uma mudança na epidemiologia das infecções sexualmente transmissíveis (IST), principalmente a sífilis, não somente nos países europeus, mas também em alguns países como a Ásia e a América do Norte e também na região do Caribe. Foi observado uma redução no número de pessoas diagnosticadas com sífilis durante esse período (Chia et al, 2021 e Cusini et al, 2021). Além disso, Furlam et al. (2022) relataram que a pandemia da COVID-19 gerou uma redução no número dos procedimentos de diagnóstico e tratamento da sífilis no Brasil, além do enfraquecimento do relacionamento entre os usuários e o sistema de saúde do país.

Desta forma, a doença apresenta incidência oscilante ao longo do tempo, com isso, ainda em 2021, a sífilis apresenta alta prevalência constituindo-se em um problema de saúde pública no Brasil e segundo a OMS (2021), o panorama da sífilis no Brasil não diverge da de outros países. Os números de casos são preocupantes, o que demonstra a necessidade de reforço às ações de vigilância, prevenção e controle da infecção.

Em 2010, a sífilis adquirida teve sua notificação compulsória implantada em todo território nacional apresentando taxa de detecção aumentada de 2,0 casos por 100 mil habitantes em 2010, para 42,5 casos por 100 mil habitantes em 2016 no Brasil. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), ainda em 2016, foi diagnosticada 6,3 milhões de casos da doença em todo o mundo, com uma prevalência global estimada de 0,5%. No Brasil, a doença passou a ser considerada uma epidemia devido à aumento significativo no número de casos nos últimos anos (Brasil, 2017). Em 2023, o Brasil registrou 242.826 casos de sífilis adquirida, com uma taxa de detecção de 113,8 casos por 100.000 habitantes. A distribuição regional foi a seguinte: 114.913 casos (47,3%) na região Sudeste, 49.931 (20,6%) no Sul, 39.391 (16,2%) no Nordeste, 20.881 (8,6%) no Centro-Oeste e 17.710 (7,3%) no Norte (Brasil, 2024). Santa Catarina apresentou a taxa mais alta de detecção de sífilis adquirida entre as unidades federativas, com

233,7 casos por 100.000 habitantes. No Nordeste, nenhuma unidade federativa superou a taxa nacional, com o Piauí registrando a menor taxa da região, de 31,5 casos por 100.000 habitantes, subentendendo um possível subdiagnóstico ou até mesmo uma falta de acessibilidade ao serviço público (OMS, 2024).

Em 2024, a epidemiologia da sífilis no Brasil continua a ser um desafio significativo para a saúde pública. Apesar dos avanços na prevenção e no tratamento, a falta de diagnóstico precoce e a continuidade do tratamento ainda são barreiras significativas. A distribuição geográfica dos casos mostra variações regionais, com algumas áreas registrando taxas mais altas de infecção (Brasil, 2024).

Num estudo de Pinchera et al. (2022) e Pinheiro e Silva (2022) foi constatado que poucas pessoas realizam triagem após relações sexuais de risco ou mediante orientação médica. Além disso, a sífilis na região europeia, bem como no Brasil não acomete essencialmente apenas determinados grupos sociais, nem está associada a fatores de risco específicos. Esse cenário emergente deve alertar as autoridades competentes sobre a necessidade urgente de implementar atividades de triagem, prevenção e conscientização sobre essa doença.

A sífilis afeta desproporcionalmente pacientes que vivem em lares que têm menor status socioeconômico. Além disso, baixos níveis de educação materna, comportamentos sexuais de alto risco, abuso de substâncias (como metanfetamina e heroína), moradia instável, violência doméstica, falta de plano de saúde e acesso precário a cuidados pré-natais são fatores que contribuem para essa vulnerabilidade. Essas condições aumentam a susceptibilidade desses indivíduos à doença, destacando a necessidade de estratégias de saúde pública inclusivas e direcionadas para combater a disseminação da sífilis e fornece o suporte necessário (Fang et al, 2022). A conscientização e a educação sexual são essenciais para prevenção e combater a propagação da doença. O Ministério da Saúde continua a implementar programas de vigilância e a promover o uso de preservativos para reduzir a incidência de sífilis e outras infecções sexualmente transmissíveis. A colaboração entre governos, organizações não governamentais e a comunidade é fundamental para enfrentar esse problema de saúde pública de forma eficaz (Brasil, 2024).

1.2. AGENTE ETIOLÓGICO: *Treponema pallidum*

A *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* (doravante denominado *T. pallidum*) pertence a uma família de bactérias em forma de espiral (espiroquetas) da ordem Spirochaetales, gênero *Treponema*, da família dos Treponemataceae, que vem do grego trepein

(girar) e nema (hilo, filamento), que significa o “filamento que gira” (Braga, 2018; Gaspar et al, 2021; Sankaran et al, 2023).

Está relacionada a quatro patógenos humanos que causam doenças. As espécies patogênicas são *T. pallidum* subsp. *Pallidum* (TPA), causadora da sífilis venérea; *T. pallidum* subsp. *endemicum*, que causa a sífilis endêmica (bejel); *T. pallidum* subsp. *pertenue*, responsável pela boubá ou framboesia; e *T. carateum*, agente etiológico da pinta. Estudos iniciais indicaram que esses quatro patógenos eram morfologicamente indistinguíveis e podem ser diferenciados de *T. pallidum* pelas manifestações clínicas de suas respectivas doenças e, mais recentemente, por diferenças genéticas (Centurion-Lara et al, 1998; Lafond; Lukehart, 2006; Avelleira; Bottino, 2006; Mubemba et al, 2020).

Trata-se de uma bactéria exclusiva do ser humano, gram-negativa, não cultivável, microaerofílica, helicoidal, móvel e que tem tropismo por diversos órgãos e tecidos. A *T. pallidum*, possui extrema capacidade de invasão e rápida fixação em superfícies celulares e penetração nas junções endoteliais e nos tecidos, devido a sua motilidade e habilidade de aderir às células e a quimiotaxia que contribuem para a virulência do mesmo (Edmondson et al, 2018).

A bactéria *T. pallidum* não sobrevive por muito tempo sem o seu hospedeiro natural e apresenta sensibilidade ao meio externo. Em forma de saca rolhas exibe um movimento rotativo característico de ida e volta, girando em torno do seu maior eixo facilitando a sua penetração nos tecidos do organismo hospedeiro (Jepsen et al, 1968; Horváth, 2011; Mubemba et al, 2020).

A membrana externa do *T. pallidum* não contém lipopolissacarídeos e tem relativamente poucas proteínas transmembranares expostas à superfície. A falta de alvos imunes na membrana externa levou o *T. pallidum* a ser rotulado como um patógeno furtivo (invisível) (Salazar et al, 2002; Lafond; Lukehart, 2006; Radolf, et al, 2016; Haynes et al, 2024).

A *T. pallidum* apresenta cerca de cinco a vinte micrômetros (5-20 μ m) de comprimento e 0,1 a 0,2 μ m de espessura, é protegido por um envelope externo de base proteica, não possuindo membrana celular constituído por filamentos lineares de dois aminoácidos, N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico, que estão conectados por ligações cruzadas de cadeias peptídicas, proporcionando estabilidade estrutural (Backhouse; Nesteroff, 2001; Reis et al, 2023).

As lipoproteínas de superfície e glicolipídios são encontrados principalmente na membrana externa, mas também podem ser encontrados em diferentes compartimentos celulares, como a matriz extracelular e os espaços periplasmáticos, e é através desses componentes estruturais que as espiroquetas interagem com o hospedeiro. A distribuição

dessas lipoproteínas varia entre as espiroquetas. As lipoproteínas pró-inflamatórias do *T. pallidum* estão localizadas abaixo de sua superfície celular e não interagem diretamente com o sistema imunológico do hospedeiro. Portanto, *T. pallidum* intacto desencadeia uma resposta inflamatória muito menos acentuada do que quando lisados (Radolf, 1995; Peeling; Hook, 2006; Salazar et al, 2007; Kelesidis, 2014; Haynes et al, 2024).

1.3. PATOGÊNESE E IMUNOPROTEÔMICA DA *Treponema pallidum*

O principal padrão molecular associado a patógeno (PAMP) de *T. pallidum* descrito são as lipoproteínas, responsáveis por diversas funções, desde transporte de lipídios a sinalização celular. As lipoproteínas, em relação a funcionalidade, podem estar diretamente correlacionadas à evasão ou à ativação do sistema imunológico do hospedeiro, através da interação que ocorre via receptores Toll do tipo 2 (TRL2) em a presença de CD14, ativando a via NK- κ B (Lien et al, 1999; Kelesidis, 2014; Braga, 2018; Chen et al, 2022). De acordo com Haynes et al. (2023), a lipoproteína de *T. pallidum* é um dos principais antígenos utilizados em testes sorológicos para sífilis, devido à sua capacidade de desencadear uma resposta imunológica significativa.

Os patógenos são detectados por macrófagos teciduais e células dendríticas, estas últimas percorrem os linfonodos de drenagem para apresentar antígenos treponêmicos às células-T, que, uma vez ativadas, colaboram com a ativação das células B, formando um repertório de células inatas e adaptativas reações respostas imunes contra *T. pallidum* (Braga, 2018; Garcia et al, 2022).

Demonstrou-se que o *T. pallidum* é capaz de estimular a proliferação de células T antígeno-específicas tanto no baço quanto nos linfonodos em poucos dias após o primeiro contato, e que essa alta resposta proliferativa é mantida por um período que varia entre semanas e meses (Arrol et al, 1999; Reid et al. 2024). Segundo Salazar et al. (2024) a infecção por *T. pallidum* induz uma resposta específica de células T CD4⁺ no sangue e na pele. As células T específicas para *T. pallidum* persistem como memória em ambos os compartimentos por longos períodos após o tratamento.

As principais células encontradas tanto no sangue periférico quanto no local da lesão são macrófagos, células-T CD4 e CD8 e células dendríticas com maior predominância de células T CD4 na lesão inicial, cancro duro, com alteração para CD8 na sífilis secundária (Tosca et al, 1988; Fan, et al, 2004). Estudo anterior de Tang et al. (2023) demonstrou que grandes quantidades de macrófagos, linfócitos e células T CD4⁺ e CD8⁺ infiltram lesões de sífilis

primária. Essas células cercam *T. pallidum*, proliferam e produzem IL-2 e IFN- γ , indicando a maturidade fenotípica das células Th1.

Desde a conclusão do Projeto Genoma Humano em 2001, a era genômica foi proclamada pela comunidade biológica. A tecnologia de sequenciamento evoluiu rapidamente desde a primeira geração em 1977 até a terceira geração de sequenciamento de alto rendimento, permitindo avanços significativos na investigação do material genético humano. Além disso, o campo das tecnologias ômicas, incluindo transcriptômica, proteômica, metabolômica, genômica e outras, está se expandindo rapidamente. Com essas ferramentas, pode-se realizar investigações mais profundas e completas, identificando elementos críticos que influenciam a condição fisiológica de um organismo através da análise sistemática de seus fenótipos e mecanismos. Ao explorar ainda mais a patogênese da sífilis, pode-se rastrear marcadores específicos e determinando seu processo de desenvolvimento, examinando as relações entre dados ômicos, como a relação causal entre RNA e proteínas e a correlação entre RNA não codificador e proteínas. Para melhorar a compreensão do mecanismo patogênico de *T. pallidum* e fornece sugestões multifacetadas para o tratamento da sífilis, o uso de diversas tecnologias ômicas é essencial na pesquisa de *T. pallidum* (Xinyan, et al, 2025).

O primeiro genoma de *T. pallidum* subsp. *pallidum* (cepa Nichols) foi sequenciado em 1998 (Fraser et al, 1998). Este organismo possui um genoma relativamente pequeno, onde apenas 55% dos 1041 quadros de leitura abertos são reconhecidos como funcionalmente biológicos, indicando que ele depende da biossíntese do hospedeiro para algumas de suas necessidades metabólicas. Estudos de hibridização DNA-DNA mostraram que a homologia entre o DNA da espiroqueta da sífilis venérea e o DNA dos treponemas cultiváveis (*T. phagedenis* e seus biótipos Reiter e Kazan) é inferior a 5%, mas indistinguível do DNA da espiroqueta da bouba *T. pallidum*. Este achado levou à reclassificação dos agentes da sífilis endêmica, sífilis venérea e bouba como *T. pallidum* subsp. *endemicum*, *T. pallidum* subsp. *pallidum* e *T. pallidum* subsp. *pertenue*, respectivamente. O sequenciamento genômico identificou essas subespécies como clonais, embora formem clusters genéticos distintos (Jaiswal et al, 2020).

O genoma da *T. pallidum* não revela fatores de virulência clássicos, característicos de bactérias Gram-negativas, o que explicaria os sinais e sintomas da infecção. Resumindo, é demonstrada a falta de enzimas citolíticas, exotoxinas e lipopolissacarídeos (LPS). Portanto, os aspectos patogênicos da sífilis estão relacionados (a) a genes associados à motilidade e (b) genes Tpr, que codificam proteínas de membrana externa que atuam como porinas e adesinas (Casal; Araújo; Corvelo, 2012). Lieberman et al. (2021) relata que o sequenciamento do

genoma de *T. pallidum* de seis continentes revelou variabilidade em genes candidatos a vacinas e a dominância de cepas da linhagem de Nichols em Madagascar. Este estudo fornece informações detalhadas sobre a diversidade genética de *T. pallidum* e destaca a importância dos genes de proteínas de superfície no desenvolvimento de vacinas.

Os desafios históricos no cultivo *in vitro* de *T. pallidum* subsp. *Pallidum* (TPA) impõem desafios à pesquisa sobre a sífilis. No entanto, os avanços no sequenciamento do genoma completo (WGS) diretamente de espécimes biológicos aumentaram significativamente o número de genomas disponíveis e melhoraram nossa compreensão da diversidade genética do TPA. Estudos recentes identificaram duas linhagens filogenéticas profundas de TPA, que se diferenciam pela sua relação com as cepas de referência Nichols ou SS14. O mapeamento de variantes de nucleotídeos únicos (SNVs) em modelos estruturais de proteínas de membrana externa Gram-negativas (OMPs), pode identificar regiões de variabilidade de sequência importantes para o desenvolvimento de vacinas e compreensão da patogênese (Seña et al, 2024).

A recombinação genética é responsável pela grande variação antigênica encontrada no *T. pallidum*. Após a sequência genômica de *T. pallidum* subsp. *pallidum*, a pesquisa da sífilis se concentrou nos genes Tpr (repetição de *T. pallidum*), uma família de 12 genes relacionados que se espera que codifiquem proteínas da membrana externa e que parecem constituir uma variação antigênica. Até o momento, nenhum antígeno de superfície foi identificado em *T. pallidum*, devido à impossibilidade de cultivo em meio artificial, à extrema fragilidade de sua membrana externa e à baixa densidade de proteínas integrais em seu compartimento celular (Giacani et al, 2005; Deka et al, 2006; Lafond et al, 2006; Jaiswal et al, 2020).

A família formada por 12 genes, são divididos em três subfamílias, com base na homologia da sequência de aminoácidos: (I) tprC, tprD, tprF, tprI; (II) tprE, tprG, tprJ, e (III) tprA, tprB, tprH, tprK, tprL. A função e localização celular desses genes ainda é desconhecida, porém, observa-se que a maioria das proteínas codificadas induz uma resposta imune na sífilis experimental (Weinstock et al, 1998; Giacani et al, 2007; Jaiswal et al, 2020).

Os genes Tpr são expressos de forma variável em diferentes treponemas e, portanto, seu papel na persistência de infecções treponêmicas no hospedeiro imunocompetente também foi sugerido. TprK é o gene mais variável dentro da cepa Tpr. A extrema variabilidade deste gene é em grande parte responsável pela infecção crônica. Considerando que as células T reconhecem regiões conservadas de TprK, a variabilidade de TprK parece ser um dos principais mecanismos de evasão imune associados à reinfeção do hospedeiro (Giacani, 2010; Smajs et al, 2012; Lin et al, 2021).

T. pallidum evita a detecção pelo sistema imunológico principalmente por meio de sua membrana externa, que apresenta uma densidade extremamente baixa de proteínas expostas na superfície (Radolf; Norgard; Schulz, 1989; Walker et al, 1989; Radolf, 1995; Radolf; Kumar, 2018) não possui lipopolissacarídeos (LPS) e cardiolipinas (Hardy; Levin, 1983; Radolf et al, 1995), e contém poucas proteínas transmembrana antigênicas (Salazar et al, 2002; Lafond; Lukehart, 2006; Radolf et al, 2016; Haynes et al, 2024), figura 1. Além disso, a bactéria se camufla com moléculas derivadas do hospedeiro, como albuminas, inibindo respostas antimicrobianas, como a atividade da CXCL9 (Kronvall et al, 1979; Egesten et al, 2011), o que lhe permite persistir no organismo por longos períodos. A fragilidade da OM também contribui para a evasão imune (Cox et al, 1992), pois sua remoção expõe proteínas subjacentes que desencadeiam uma resposta imunológica mais intensa (Radolf et al, 1988; Cox et al, 1992).

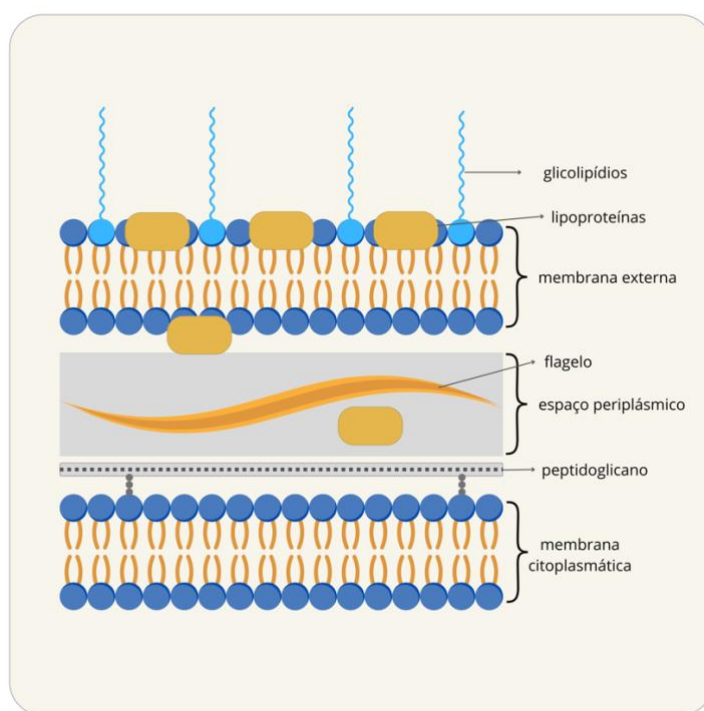


Figura 1 – Ilustração da arquitetura da membrana externa da *T. pallidum*
 Fonte: Adaptado de (Schroder et al, 2008) e (Kelesidis, 2014).

É amplamente aceito que a variação antigênica permite que *T. pallidum* evite a depuração pelo sistema imunológico do hospedeiro. As raras proteínas da membrana externa, expostas na superfície do patógeno, têm atraído muita atenção. As famílias de proteínas repetidas de *T. pallidum* (Tprs) foram identificadas como parte do repertório de proteínas da membrana externa da espiroqueta. O TprK, um membro da família Tpr, é considerado não apenas um principal candidato a vacinas, mas também uma importante estratégia de evasão imunológica desenvolvida por *T. pallidum* (Liu et al, 2023).

O gene *tprK*, que codifica proteínas, possui sete regiões V (V1 a V7), cada uma flanqueada por domínios altamente conservados. Essas regiões V são expostas como *loops* na superfície, tornando-se alvos de anticorpos na infecção sífilítica experimental. A diversidade das regiões V é gerada pela conversão gênica segmentar não recíproca, criando mais de um milhão de novas sequências V, resultando em grande diversidade intra e intercepa do gene *tprK*. Em resposta à seleção imunológica do hospedeiro, o gene *tprK* acumula notável diversidade. Compreender a variação de TprK é essencial para decifrar o mecanismo de infecção por espiroquetas ao longo da vida (Liu et al, 2019; Lin et al, 2021; Liu et al, 2023).

Recentemente, abordagens para compreender a variação antigênica de TprK têm se concentrado no sequenciamento de leitura curta. Pesquisadores descobriram sequências V em grande escala e obtiveram *insights* sobre a diversidade das sete regiões V do gene *tprK*. No entanto, as limitações do sequenciamento de leitura curta dificultaram a resolução das conexões entre as regiões V, resultando na perda de informações importantes sobre os perfis completos das variantes de *tprK* (Liu et al, 2023).

O imunoproteoma de *T. pallidum* consiste em proteínas que induzem resposta imune e reagem com soros de pacientes com sífilis. Estudos detectaram apenas 34-38 antígenos reativos das proteínas de *T. pallidum* extraídas de tecidos testiculares de coelhos infectados. A análise proteômica global é essencial para entender a patogênese bacteriana e a biologia dos patógenos, incluindo: (1) quantificação de proteínas em diferentes condições de cultivo; (2) comparação de perfis de expressão de proteínas específicas, especialmente as associadas à virulência; (3) confirmação de proteínas funcionalmente não anotadas e "proteínas hipotéticas"; e (4) identificação de proteínas essenciais para a sobrevivência e função básica (Brinkman et al, 2006; McGill et al, 2010; Houston et al, 2023).

O genoma de *T. pallidum* possui cerca de 1000 genes codificadores de proteínas. A análise proteômica global da bactéria é complicada por ser um patógeno humano obrigatório, geralmente cultivado *in vivo* em modelos animais como coelhos, ou *in vitro*, utilizando-se células epiteliais de coelho. Essas condições produzem poucas bactérias e resultam em proteínas contaminadas com proteínas de coelho, dificultando a detecção de proteínas menos abundantes. Outro obstáculo enfrentado na pesquisa do *T. pallidum*, principalmente para a identificação de antígenos, é a frágil membrana externa da bactéria e seu baixo teor de proteína (Mcgill et al, 2010; Houston et al, 2023). A membrana externa de *T. pallidum* é facilmente danificada por procedimentos experimentais como centrifugação ou detergentes não iônicos em baixas concentrações (Cox et al., 1992), dificultando a confirmação proteômica de proteínas de membrana externa (OMPs) raras. Apesar desses desafios, dois estudos identificaram um total

de 587 proteínas de *T. pallidum* em infecções experimentais em coelhos, cobrindo aproximadamente 60% do proteoma treponêmico (Houston et al, 2023).

Diversas lipoproteínas participam das interações entre os componentes patogênicos de *T. pallidum* e o hospedeiro. As lipoproteínas, como principal fator de virulência de Tp, desempenham um papel importante no desenvolvimento da inflamação, induzindo células imunológicas a liberar citocinas como IL-6 e IL-1 β . O estudo de Zheng, et al. (2023) destaca que a Tp47 provoca vasculites caracterizadas por infiltração de células imunológicas perivasculares e trombose, consistente com as características patológicas da sífilis. E ainda revelou que a lipoproteína Tp47 de *T. pallidum* aumenta a secreção de IL-6 em fibroblastos humanos via TLR2, através das vias de sinalização p38, PI3K/Akt e NF- κ B, o que pode explicar a inflamação local causada por *T. pallidum* durante a infecção sífilítica.

As células dendríticas são uma das principais células imunocompetentes encontradas em locais de infecção da sífilis precoce, como membranas mucosas ou pele, onde desempenham um papel crucial na eliminação da *T. pallidum*. No entanto, ainda não foram realizados estudos sobre a capacidade migratória das células dendríticas após a infecção por *T. pallidum*. Pesquisas anteriores demonstraram que as proteínas e lipoproteínas da membrana externa de *T. pallidum* são os principais componentes da resposta imune contra essa bactéria (Cheng et al, 2023). Entre elas, a lipoproteína de membrana de Tp47 é a proteína de membrana mais abundante e possui forte antigenicidade e boa especificidade, modulando principalmente a inflamação induzida por *T. pallidum*.

Os PAMPs ativam vias de sinalização específicas que induzem a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, sendo considerados principais mediadores pró-inflamatórios. No entanto, devido à estrutura única da membrana externa de *T. pallidum* (Figura 1), que não possui lipoproteínas expostas na superfície, esses PAMPs não são facilmente acessíveis aos TLRs nas células. Neste estudo, demonstrou-se que a Tp0574 (Tp47), uma proteína da membrana interna de *T. pallidum*, promove a secreção de IL-6 através de TLR2 em fibroblastos. Estudos anteriores relataram que várias lipoproteínas da membrana interna de *T. pallidum*, como Tp0574 (Tp47), Tp0435 (Tp17), e Tp0171 (Tp15), têm forte imunogenicidade, sugerindo que essas lipoproteínas são os principais fatores de virulência de *T. pallidum*, e seu mecanismo precisa ser mais estudado (Zheng et al, 2023).

Li. et al. (2021) que também estudou proteínas recombinantes do *T. pallidum* descreveu que a Tp0768 é considerada um antígeno dependente de infecção por *T. pallidum* e altamente imunogênico (também conhecido como TpN44.5 ou TmpA). Este antígeno demonstrou alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico sorológico da sífilis (Liu et

al. 2019). No entanto, a patogênese do Tp0768 ainda não está clara. Os autores mencionaram que erros de PCR em seus clones de plasmídeos podem ter alterado a imunogenicidade dos epítomos alvo, explicando por que antígenos conhecidos de *T. pallidum* não foram detectados. Estes estudos preenchem uma lacuna significativa no conhecimento sobre a sífilis, ao analisar o desenvolvimento de anticorpos contra cada proteína de *T. pallidum* durante a infecção e as mudanças na imunidade adquirida após o tratamento. Ainda assim, a comparação dos 30 antígenos mais reativos entre os estudos mostrou resultados semelhantes, com 20 alvos compartilhados e apenas quatro proteínas (Tp0872, Tp0259, Tp0594 e Tp0737) e seis alvos (Tp0453, Tp0272, Tp0841, Tp0369, Tp0468 e Tp0433) reconhecidos por estudos anteriores, mas com maior reatividade no presente estudo (Campo et al, 2024).

Dos três alvos atualmente usados em testes treponêmicos (TTs) baseados em proteínas recombinantes, as lipoproteínas Tp0574 (também conhecida como TpN47) e Tp0435 (TpN17) foram os antígenos mais reconhecidos por todos os coelhos neste estudo. No entanto, a lipoproteína Tp0171, (também conhecida como TpN15), considerada uma parte de uma construção de antígeno triplo que inclui a Tp0574 e a Tp0435 (Haynes et al, 2023; Campo et al, 2024), não apresentou alta imunorreatividade em animais infectados. Os soros de coelho tornaram-se significativamente positivos para Tp0171 entre os dias 40 e 50 após a inoculação, o que não apoia totalmente o uso deste antígeno para diagnóstico precoce, apesar de sua alta expressão e conservação em cepas e subespécies de *T. pallidum*. Os dados de imunização indicam que alguns antígenos dispensáveis apresentam desafios para a indução de uma resposta imune eficaz, o que apoia essa hipótese. No entanto, pesquisas recentes sugerem que a imunidade contra esse antígeno pode desempenhar um papel funcional na inibição da disseminação da *T. pallidum*, o que é consistente com sua função como adesina de ligação à fibronectina (Campo et al, 2024).

Estudos anteriores de proteômica globais baseados em espectrometria de massa (MS), detectaram a expressão de um total combinado de 847 proteínas de *T. pallidum*, correspondendo a 86% de cobertura do proteoma. Esses estudos também forneceram *insights* sobre os perfis de expressão de classes específicas de proteínas de interesse durante a infecção, incluindo a detecção de OMPs conhecidas ou previstas, proteínas candidatas a vacinas e proteínas com funções de virulência putativas (Houston et al, 2023).

Vários antígenos, como Tp0171, Tp0435, Tp0574 e TPMA, foram utilizados para desenvolver métodos específicos de teste de anticorpos. A Tp0435, um antígeno altamente imunogênico, mostra diferentes títulos de anticorpos nos estágios primário, secundário e latente da sífilis. Anticorpos para Tp0435 podem ser detectados nos soros de pacientes com sífilis

inicial e intermediária, tornando Tp0435 o antígeno mais promissor de *T. pallidum* devido aos altos e estáveis níveis de anticorpos e seu longo tempo de manutenção (Zhang et al, 2024).

As lipoproteínas desempenham um papel significativo na permeabilidade da membrana externa e na adesão a biopolímeros e na variabilidade antigênica do *T. pallidum*, determinando o interesse atual pelo seu papel na patogenicidade e seu uso para fins de diagnóstico. Os dados do imunoproteoma sugerem a baixa imunogenicidade do *T. pallidum*, e permitem especificar os antígenos mais promissores para o imunodiagnóstico da sífilis (Kubanov et al, 2017; Zhang et al, 2024).

1.4. DIAGNÓSTICO

Sem tratamento, a infecção por sífilis pode progredir através de uma ampla gama de sintomas que se dividem em estágios: primário, secundário, latente e terciário. O estágio primário começa aproximadamente três semanas após a exposição (variando de 10 a 90 dias) e é marcado pelo aparecimento de um único cancro, geralmente indolor, no local de exposição ao *T. pallidum*. Esse cancro tende a desaparecer espontaneamente em um período de 3 a 6 semanas. Em alguns casos, podem surgir múltiplos cancros ou cancros dolorosos, bem como linfadenopatia próxima ao local da infecção, aumentando a chance de detecção (Golden et al, 2003; Tudor et al, 2023).

O estágio secundário apresenta sintomas variados, incluindo diferentes formas de erupções cutâneas, alopecia irregular, lesões nas membranas mucosas (como manchas mucosas na boca, vagina ou ânus) e/ou condiloma lata em áreas de dobras da pele. Esses sinais e sintomas geralmente aparecem de duas a oito semanas após a resolução do cancro primário, embora em alguns casos o cancro ainda possa estar presente. Lesões primárias e secundárias (cancros, manchas mucosas e condiloma lata) contêm grandes concentrações de espiroquetas e são altamente infecciosas (Cohen et al, 2013; Peeling et al, 2017; Satyaputra et al, 2021).

Os sintomas secundários da sífilis normalmente desaparecem entre 3 a 12 semanas sem tratamento. No estágio latente, não há sinais ou sintomas visíveis da doença. Esse estágio pode ocorrer entre os estágios primário e secundário ou somente após o estágio secundário. Se a sífilis não for tratada, o estágio latente pode durar anos. Distinguem-se a sífilis latente precoce (dentro de um ano após a infecção inicial) e a sífilis latente tardia (um ano ou mais após a infecção inicial) por meio da revisão dos sintomas, tratamentos anteriores, sorologias e histórico sexual (Cohen et al, 2013; Peeling et al, 2017; Satyaputra et al, 2021; Cao et al, 2023).

A sífilis terciária pode surgir anos ou até décadas após a infecção inicial e geralmente se manifesta por lesões gomosas, sífilis cardiovascular, sintomas psiquiátricos (como perda de memória ou mudanças de personalidade) ou neurosífilis tardia (ex.: tabes dorsalis e paresia). Indivíduos com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou imunocomprometidos podem progredir mais rapidamente. A neurosífilis pode ocorrer em qualquer estágio da sífilis e é caracterizada por disfunção dos nervos cranianos, meningite, AVC, perda da sensação de vibração, anormalidades auditivas ou oculares, ou estado mental alterado. Vale ressaltar que, em qualquer momento da gravidez, o *T. pallidum* pode atravessar a placenta e causar sífilis congênita (Cao et al, 2023).

Os diagnósticos de sífilis atualmente disponíveis podem ser divididos em duas categorias principais: testes diretos e testes sorológicos. Os testes diretos incluem a microscopia de campo escuro, que permite a visualização direta do *T. pallidum* em lesões ativas, e os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs), que detectam o DNA do patógeno. Os testes sorológicos, por sua vez, são mais comumente utilizados e subdividem-se em testes não treponêmicos (TNT), como laboratório de pesquisa de doenças venéreas - do inglês: “*Venereal Disease Research Laboratory*” (VDRL) e teste rápido de cartão de reagina plasmática (RPR), e testes treponêmicos (TT), como “*T. pallidum haemagglutination assay*” (TPHA), “*fluorescent treponemal antibody absorption*” (FTA-ABS), “*T. pallidum particle agglutination*” (TPPA) e testes rápidos (Satyaputra et al, 2021; Purwoko et al, 2021; Luo et al, 2021; Zarakolu et al, 2023; Flipse et al, 2023; Cao et al, 2023).

Apesar de muitos testes diagnósticos disponíveis para a sífilis, ainda não há um teste satisfatório reconhecido mundialmente, e o diagnóstico geralmente depende de uma combinação de vários testes. Como os testes não treponêmicos são trabalhosos e carecem de sensibilidade na sífilis primária e nos estágios tardios da infecção, um número crescente de laboratórios clínicos mudou para a triagem de pacientes usando o 'algoritmo reverso', que começa com um ensaio treponêmico seguido por um teste quantitativo não treponêmico. No entanto, esse algoritmo mostrou altas taxas de falsas reações em populações com baixa prevalência de sífilis (Centers For Disease And Prevention 2011; Park et al, 2011; Satyaputra et al, 2021; Pham et al, 2022; Zhang et al, 2024).

O diagnóstico, quando fundamentado em manifestações clínicas, requer a realização de exames laboratoriais, os quais são particularmente cruciais em casos assintomáticos. Estes exames compreendem testes treponêmicos (TT) e não treponêmicos (TNT). Os testes não treponêmicos são empregados na triagem da sífilis, envolvendo diversos algoritmos de rastreamento. As metodologias mais frequentemente utilizadas são o algoritmo

tradicional, o algoritmo reverso e o algoritmo do Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC). No algoritmo tradicional, a triagem inicia-se com um teste não treponêmico, como o RPR ou VDRL. Na eventualidade de um resultado positivo, procede-se à realização de um teste treponêmico para confirmação. O algoritmo reverso, por sua vez, principia com um teste treponêmico. Em caso de positividade, um teste não treponêmico é subsequentemente executado. A abordagem reversa é preferencial na identificação de novas infecções, visto que os testes treponêmicos tendem a apresentar positividade anteriormente aos não treponêmicos. O algoritmo do ECDC também se inicia com um teste treponêmico. Diante de um resultado reativo, um segundo teste treponêmico confirmatório é realizado, sem a utilização de testes não treponêmicos em qualquer etapa. Esta abordagem mostra-se útil na prevenção de resultados falso-positivos que podem ocorrer com testes não treponêmicos (Brasil, 2020; Gaspar et al, 2021; Brasil, 2021; Cao et al, 2023).

Em resumo, os testes não treponêmicos detectam anticorpos antilipoidais que surgem cerca de seis semanas após a infecção. Inicialmente, um teste não treponêmico qualitativo é utilizado para rastrear os anticorpos. Se o resultado for positivo, o teste é repetido quantitativamente, com resultados reportados como títulos dilucionais, que refletem a variação dos anticorpos ao longo do curso natural da doença. Os níveis de anticorpos e seus títulos normalmente diminuem com o tratamento adequado, permitindo que os títulos sejam usados para monitorar a resposta ao tratamento. Geralmente, uma queda de quatro ou duas diluições no título (por exemplo, de 1:16 para 1:4) indica uma resposta adequada ao tratamento. Um aumento do título após o tratamento pode sugerir reinfecção, e qualquer aumento de quatro vezes ou mais deve ser investigado minuciosamente. Em alguns indivíduos infectados por vários anos, o teste não treponêmico pode permanecer reativo em títulos baixos mesmo após o tratamento adequado, uma condição conhecida como “serofast” (Cao et al, 2023).

Na sífilis primária, os critérios diagnósticos baseiam-se em resultado de campo escuro positivo ou reação em cadeia da polimerase (PCR) de material de cancro, ou uma combinação de diagnóstico clínico e testes sorológicos positivos. A sífilis secundária é diagnosticada usando exame de campo escuro positivo e testes treponêmicos reativos ou não treponêmicos alternativos. Em alguns estágios, a doença pode ser assintomática, gerando dificuldade no diagnóstico de sífilis precoce, neurosífilis e sífilis terciária (Tuddenham et al, 2020).

A reatividade dos testes sorológicos para sífilis depende dos estágios da doença e do período de incubação. Sendo assim, a sífilis primária possui um período de incubação entre 10 e 90 dias e o teste FTA-ABS fica positivo após dez dias de evolução do cancro duro. A sífilis

secundária se manifesta devido a fase primária não ter sido diagnosticada e devidamente tratada, assim, os testes sorológicos reagentes e testes quantitativos apresentam altos títulos (complexo antígeno-anticorpo). Após o tratamento os valores de testes treponêmicos atualmente disponíveis permanecem reagentes por toda a vida e os não treponêmicos são variáveis. Na fase terciária as manifestações demoram anos para aparecer, os testes são reagentes com títulos baixos (complexo antígeno-anticorpo) ou até mesmo negativos nos testes não treponêmicos, na fase latente os sintomas desaparecem por um tempo e os testes sorológicos são reagentes e os qualitativos com títulos baixos (Xu et al, 2016; Liu et al, 2019).

Um diagnóstico imunológico baseado em teste treponêmico sensível e específico, com elevada acurácia ajudará a definir a exposição ao *T. pallidum*, tornando-se uma ferramenta de vigilância epidemiológica. Neste sentido, a aplicação de ferramentas de bioinformática vem crescendo em novas estratégias de desenvolvimentos de testes diagnósticos. Uma delas é a identificação de epítomos conformacionais por bioinformática, a qual tem se mostrado uma ferramenta útil para o desenvolvimento de antígenos de imunoenaios para detecção de anticorpos específicos (Stavrakoudis, 2010; Lage et al, 2016; Rodrigues et al, 2019; Amrun et al, 2020; Scussel et al, 2022).

A maioria dos determinantes antigênicos reconhecidos por células B e anticorpos são conformacionais, sendo úteis como revestimento de antígeno em ELISA. Esses epítomos compreendem resíduos de aminoácidos não contíguos na sequência primária da proteína, que formam regiões específicas após o dobramento da proteína, refletindo a conformação estrutural nativa da proteína (Laver et al, 1990). Com a bioinformática, pode-se desenhar um peptídeo que mimetizaria a região epitópica de forma que ela fosse específica somente para a sífilis eliminando assim as reações cruzadas. O uso de proteínas recombinantes não extingue a possibilidade de reações cruzadas, visto que mantém conservada regiões de alta similaridade com outras proteínas de subespécies de *T. pallidum* e de outros agentes etiológicos de doenças que apresentam reação cruzada com sífilis, como os peptídeos são vantajosos em relação às proteínas porque são mais estáveis e duradouros que estas (Walter et al, 1986; Robson, 2020). As proteínas são mais termo sensíveis e se degradam facilmente quando expostas a grandes oscilações de pH, além disso, apresentam maiores custos e complexidade de produção quando comparadas a peptídeos (Bueno et al, 2011).

Atualmente, a combinação da genética com a bioinformática permite a obtenção de diagnósticos específicos para diversas doenças, possibilitando previsões mais precisas sobre o desenvolvimento das mesmas. Esses avanços são amplamente atribuídos à capacidade de examinar o conjunto completo de genes de um indivíduo com grande detalhe, desde alterações

nos cromossomos até modificações em níveis individuais de DNA, permitindo a identificação de mutações associadas a doenças e o desenvolvimento de tratamentos personalizados. Além disso, a bioinformática auxilia na criação de novos antígenos para imunoenaios, facilitando a detecção de anticorpos específicos (Pereira et al, 2020; Silva; Alves, 2023). Em contextos médicos, ferramentas de bioinformática, ou pipelines, podem ser utilizadas para analisar dados clínicos de pacientes, como informações genéticas. Isso permite a personalização de tratamentos e uma melhor compreensão das bases genéticas de doenças hereditárias (Silva; Alves, 2023).

Ainda não há consenso sobre quais antígenos apresentam melhor desempenho sorodiagnóstico para sífilis. Sendo assim, uma abordagem precisa e simples para o diagnóstico da sífilis permanece indefinida, e o diagnóstico continua a exigir uma avaliação abrangente do paciente e exames laboratoriais precisos. Embora os testes diretos (como microscopia ou PCR) sejam úteis na infecção precoce, os testes sorológicos continuam sendo a base do diagnóstico da sífilis (Morshed; Singh, 2015; Luo et al, 2021).

1.4.1. Testes não treponêmicos

Trata-se de testes quantitativos econômicos que produzem resultados positivos após a segunda semana e após o aparecimento do cancro de inoculação. Os títulos são mais elevados durante as fases secundária, latente precoce e tardia. No entanto, normalmente tornam-se negativos dentro de seis a doze meses, o que os torna mais adequados para a monitorização pós-terapêutica da doença. Além disso, estes testes são inespecíficos, o que significa que podem produzir resultados positivos noutras patologias (Nadal; Framil, 2007; Xie et al, 2023; Silva et al, 2024).

Estes exames possuem uma baixa sensibilidade para diagnóstico de sífilis primária precoce ou apresentam resultados falso positivos. Os indivíduos com a sífilis tardia possuem reação do teste não treponêmico, a qual pode persistir por longos períodos, caracterizada de reação de *serofast*, mesmo após o tratamento adequado, dificultando distinguir uma reação nova ou antiga (Yang et al, 2021; Cao et al, 2023).

O teste VDRL é um teste de microfloculação para detectar anticorpos no soro dos pacientes contra a reagina, ou seja, um antígeno formado por uma combinação de cardiolipina, lecitina e colesterol. Além disso, a detecção de *T. pallidum* requer microscopia (ampliação \times 100) para interpretação (Morshed; Singh, 2015; Papp et al, 2024). Tais métodos são utilizados para rastreamento da sífilis (Sonmez et al, 2019; Silva et al, 2024).

Como os antígenos usados em testes não treponêmicos são encontrados tanto nas membranas de *T. pallidum* quanto nas membranas do hospedeiro, referir-se a esses testes como "não treponêmicos" pode ser enganoso. Um estudo de Matthias et al. (2019) mostrou que 11% de 526.540 testes não treponêmicos reativos não estavam associados à sífilis, mas sim detectando anticorpos para antígenos não treponêmicos gerados por danos ao tecido do hospedeiro em outras doenças. No entanto, 89% dos testes reativos estavam ligados à sífilis, sugerindo que a maioria desses testes detecta anticorpos contra antígenos fosfolipídicos de *T. pallidum* durante a infecção. Esses testes, supostamente "não treponêmicos", poderiam ser mais apropriadamente chamados de testes de antígenos lipoidais. Nas recomendações do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (Papp et al, 2024), esses testes serão denominados como testes não treponêmicos (antígenos lipoidais).

1.4.2. Testes treponêmicos

Baseiam-se na detecção de anticorpos produzidos pelo hospedeiro em resposta imunológica aos componentes antigênicos próprios de *T. pallidum* e podem ser do tipo FTA-ABS, TPPA, TPHA, imunoensaio enzimáticos, além de testes rápidos imunocromatográficos (Who, 2013; Peeling et al, 2017; Gaspar et al, 2021).

O FTA-ABS é um ensaio de coloração imunofluorescente indireta, os antígenos da cepa Nichols são expostos ao soro suspeito após o soro ter sido misturado com um solvente. A imunoglobulina anti-humana marcada com isotiocianato de fluoresceína FITC (do inglês, *fluorescein isothiocyanate*) é adicionada e combinada com os anticorpos do paciente. Em um resultado positivo, a presença de anticorpos para *T. pallidum* é visível por microscopia de fluorescência. Por fim, quando a ocorrência acontece os treponemas podem ser consolidados pelo específico, tendo como coloração verde-maça brilhante. O FTA-ABS não é recomendado como teste de triagem de rotina para sífilis devido à sua interpretação subjetiva, incapacidade de automatizar para grandes números de amostras e a necessidade de um dispositivo de fluorescência. Reações inespecíficas ainda podem ocorrer, dando um resultado falso-positivo (Morshed; Singh, 2015; Agüero-Seña et al, 2019; Luo et al, 2021; Brasil, 2021; Maia et al, 2023).

Já o ensaio imunoenzimático (ELISA) ou de quimioluminescência emprega suportes sensibilizados com antígenos totais ou sintéticos da *T. pallidum*. Quando se tem a presença do anti-*T. pallidum* eles se ligam aos antígenos, posteriormente é adicionado um conjugado composto por IgG biotinizada anti-humana, demarcada com estreptavidina-

peroxidase, criando um complexo antígeno anticorpo conjugado. Em relação a cor da amostra ela é relacionada a quantidade de anticorpos da amostra, quanto maior a concentração na amostra maior é a intensidade da cor na placa (Brasil, 2021; Maia et al, 2023).

O ensaio imunológico com revelação quimioluminescente (quimioluminescência), baseia-se em suportes revestidos por antígenos da *T. pallidum*, aos quais se ligam aos anticorpos específicos, quando estes estão presentes nas amostras. Em seguida, haverá a revelação do teste por meio do conjugado IgG anti-humana marcada com ficoeritrina ou outra substância para gerar emissão de quimioluminescência, que é medida por um sistema fotomultiplicador (Hilgert, 2019; Brasil, 2020; Brasil, 2021).

O TPHA e o ensaio de micro-hemaglutinação (MHA-TP), do inglês *microhaemagglutination assay*) se baseiam na ligação de anticorpos treponêmicos, presentes no soro, com os antígenos fixados nas superfícies de hemácias, resultando em uma reação de aglutinação. Já no ensaio de aglutinação passiva de partículas de gelatina para *T. pallidum* o TPPA, os antígenos são adsorvidos na superfície de partículas gelatinosas e a reação acontece da mesma forma que as anteriores, levando a formação de aglutinação visível a olho nu (Morshed; Singh, 2015; Agüero-Seña et al, 2019; Brasil, 2020; Brasil, 2021; Satyaputra et al, 2021).

Os testes rápidos são testes nos quais a execução, leitura e interpretação do resultado ocorrem em, no máximo, 30 minutos, sem a necessidade de estrutura laboratorial. Podem ser realizados com amostras de sangue total obtidas por punção digital ou punção venosa, e com amostras de soro ou plasma. Utilizam os princípios metodológicos de imunocromatografia de fluxo lateral ou de imunocromatografia em plataforma de duplo percurso – DPP (do inglês *dual path platform*). Esses testes utilizam antígenos do *T. pallidum* e um conjugado composto por antígenos recombinantes de *T. pallidum* que são ligados a um agente revelador. Todos os testes possuem a região de controle interno da reação, na qual também surge uma linha colorida. Porém, em pacientes já tratadas para sífilis, estes testes permanecerão reagentes praticamente pelo resto da vida, limitando seu uso nestas condições (Brasil, 2021).

A ausência de técnicas de cultivo *in vitro* para *T. pallidum* torna extremamente difícil identificar a virulência ou fatores regulatórios envolvidos na patogênese da sífilis. Isso torna o estudo e a identificação dessa bactéria mais desafiadores, exigindo o uso de técnicas moleculares para diagnóstico e pesquisa (Posey et al, 1999; Deka et al, 2006; Oliveira, 2016; Gaspar et al, 2021). *T. pallidum* só é cultivável em culturas celulares ou modelos animais, desta forma, é difícil isolar e cultivar esse agente, atrapalhando novas descobertas de diagnóstico.

Além disso, sua observação por microscopia convencional se torna difícil pela dificuldade de corar a bactérias com corantes comuns, fazendo-se necessário contraste de fase, coloração de prata ou imunofluorescência (Salomão, 2017). Ainda, o *T. pallidum* tem uma membrana externa com cem vezes menos proteína do que as membranas externas de outras bactérias, fazendo-a menos imunogênica (Blanco et al, 1997; Lafond; Lukehart, 2006; Ferreira, 2013).

A criação de novos testes diagnósticos para sífilis é de suma importância para a saúde pública. A sífilis, uma infecção sexualmente transmissível, tem mostrado um aumento nos casos globalmente, e sua detecção precoce é essencial para o tratamento eficaz e a prevenção de complicações graves, como sífilis congênita e evoluções mais graves afetando o sistema nervoso central. Testes mais precisos e específicos ajudam a identificar infecções em seus estágios iniciais, evitando a disseminação da doença. Além disso, a melhoria nos métodos diagnósticos reduz os falsos positivos e negativos, permitindo um tratamento mais adequado e eficiente. Novas tecnologias, como a bioinformática, permitem a identificação de epítomos específicos, melhorando a precisão dos testes sorológicos. Dessa forma, avanços na área diagnóstica são essenciais para controlar e eventualmente erradicar a sífilis.

Neste sentido se faz necessário o desenvolvimento de uma plataforma diagnóstica com alta sensibilidade e especificidade, podendo oferecer resultados rápidos para a sífilis. A partir da predição e síntese de moléculas peptídicas identificadas através de ferramentas de bioinformática, que projetadas como epítomos de células B humanas, provenientes de lipoproteínas imunodominantes de *T. pallidum*, é possível produzir antígenos de cobertura para sorodiagnóstico tipo ELISA. Assim, obtêm-se uma alternativa de diagnóstico ainda mais precisa e eficaz. Uma plataforma de sorodiagnóstico treponêmico eficiente, também poderia contribuir para a avaliação da eficácia de tratamento, que é uma das dificuldades encontradas pelos profissionais da área.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma plataforma de diagnóstico sorológico treponêmico com alta sensibilidade e especificidade para a sífilis, validada por estudo transversal de acurácia diagnóstica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Identificar as proteínas alvo em estudos de imunoproteômica e obter suas sequências lineares (FASTA) e estrutura 3D através do banco de dados Protein Data Bank;

II. Predizer epítopos específicos de células B das proteínas alvos;

III. Comparar a similaridade dos epítopos desenhados da *T. pallidum* na sífilis com outras proteínas da bactéria, utilizando o algoritmo Blast-P (protein-protein BLAST), utilizando o programa Clustal Ômega para o alinhamento das sequências escolhidas;

IV. Avaliar na estrutura 3D e desenhar peptídeos que mimetizem os epítopos de lipoproteínas da *T. pallidum*;

V. Sintetizar quimicamente, pela técnica FMOC-sínteses, os peptídeos desenhados;

VI. Validar os peptídeos como antígenos de cobertura em ELISA, para sorodiagnóstico de sífilis por estudo transversal de acurácia diagnóstica;

VII. Avaliar o potencial da plataforma sorológica no monitoramento do tratamento de sífilis.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal de acurácia diagnóstica onde comparam-se os resultados entre dois grupos: pacientes com a doença e aqueles sem a doença. Esses grupos podem apresentar testes diagnósticos positivos ou negativos, indicando a presença ou ausência da doença. Um estudo transversal de acurácia diagnóstica foi realizado para validar uma tecnologia de um protótipo como uma plataforma de sorodiagnóstico para sífilis, aqui definida como teste índice (Chassé; Fergusson, 2019). O conjunto de testes, definido como o algoritmo de diagnóstico para sífilis, é o padrão ouro, que foi usado como um padrão de referência para estimar a precisão, sensibilidade e especificidade do índice do teste. O estudo foi conduzido seguindo as disposições das diretrizes *Standards for Reporting Diagnostic Accuracy Studies* (Bossuyt et al, 2015).

3.2 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Os participantes foram amostrados por meio de um estudo transversal e organizados em fluxogramas de participantes usando um diagrama. Indivíduos da atenção básica de saúde da cidade de Rio Verde que procuraram os serviços de testagem e aconselhamento de ISTs do Sistema Único de Saúde (SUS), foram voluntários neste estudo. As características demográficas e clínicas basais dos participantes foram determinadas, bem como a distribuição do curso clínico e da gravidade nos participantes com a condição alvo, ou seja, sífilis positiva determinada pelo resultado/evento positivo do teste de referência (casos) (Mathes; Pieper, 2019). Assim, o perfil epidemiológico dos participantes foi determinado para avaliar a acurácia, sensibilidade, especificidade e valores preditivos do teste índice como uma ferramenta de vigilância para exposição à sífilis, apoiando o estudo da precisão diagnóstica (Scussel et al, 2022).

3.2.1 Aprovações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Rio Verde (UniRV) sob o número de protocolo CAAE: 59241322.0.0000.5077 (ANEXO A). Além disso, este estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinque, respeitando os princípios éticos para pesquisa envolvendo seres humanos. As amostras foram coletadas com

consentimento escrito de todos os pacientes, que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UniRV.

3.2.2 Critério de inclusão

Indivíduos entre 18 e 80 anos, de ambos os sexos, que tenham sido submetidos a testes de diagnóstico para sífilis, conforme algoritmo de triagem e confirmação diagnóstica, associado, ou não, ao estágio clínica da doença, diagnóstico padrão-ouro, fase de tratamento, e que aceitem participar como voluntários do estudo, e tenham assinado o TCLE.

3.2.3 Critérios de exclusão

Indivíduos que apresentem informações clínicas ou laboratoriais incompletas que inviabilizem a correta classificação diagnóstica, ou que estejam em condição de saúde que impeça a compreensão ou a participação adequada neste estudo, foram excluídos do estudo. Assim foram excluídos, os pacientes que fizeram uso recente de antibióticos que possam interferir nos testes sorológicos, indivíduos com doenças autoimunes ou outras condições que possam gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos, pessoas que não possam fornecer consentimento informado, como indivíduos com comprometimento cognitivo, e também o uso de imunossupressores ou quimioterapia, que podem alterar a resposta imunológica e comprometer a precisão dos resultados.

3.2.4 Coleta de amostras e algoritmo diagnóstico de sífilis

Amostras de sangue dos participantes foram coletadas por punção venosa de junho de 2022 a julho de 2023. Estas foram centrifugadas por 10 minutos a 2000 g, em temperatura ambiente para obtenção do soro. Após a centrifugação, os soros foram imediatamente transferidos para microtubos de centrífuga de 2 mL. As amostras de soro foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise.

Para confirmação do diagnóstico de sífilis, a abordagem foi a utilização de testes sorológicos treponêmicos, quimioluminescência e o testes não treponêmico. No CTA de Rio Verde - GO, usa-se a abordagem reversa de acordo com o Manual Técnico para o Diagnóstico da Sífilis do Ministério da Saúde (2024), conforme ilustra a figura 2. Os participantes foram acolhidos no CTA para a triagem e confirmação do diagnóstico, e a entrevista foi realizada

pelos profissionais de saúde do CTA. Após, as amostras dos participantes foram utilizadas para as avaliações ELISA baseado em peptídeos.

O teste específico de triagem treponêmico usado durante o período do estudo foi a quimioluminescência; e o VDRL foi usado como um teste não treponêmico. Quando o teste treponêmico foi reativo, mas o VDRL não, o teste rápido RPR foi usado como segundo teste treponêmico. No CTA de Rio Verde, o VDRL também é aplicado como um teste de monitoramento prognóstico, para avaliar o tratamento do paciente. Os pacientes deste estudo foram tratados com Benzilpenicilina benzatina 2,4 milhões de UI por via intramuscular em dose única.

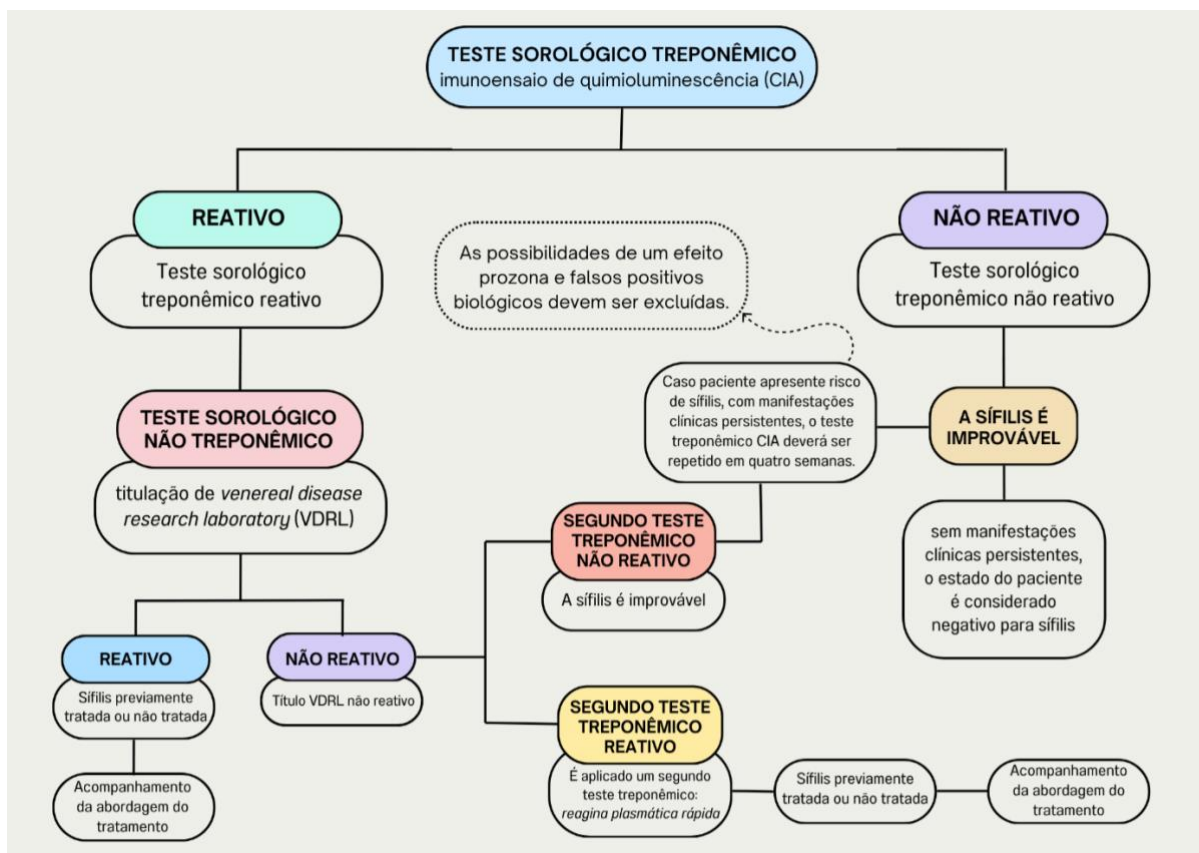


Figura 2 - Algoritmo adotado para o rastreamento da sífilis no CTA de Rio Verde/GO – Brasil. Abordagem reversa de acordo com o Manual Técnico para Diagnóstico da Sífilis do Ministério da Saúde do Brasil (2022). Fonte: Da autora, 2025.

3.3 DESING DA PLATAFORMA DE SORODIAGNÓSTICO DE SÍFILIS

3.3.1 Análises de bioinformática

As proteínas Tp0171, Tp0435, Tp0574, Tp0684 e Tp0453 foram selecionadas seguindo os critérios: imunogênicas e antigênicas vastamente validadas em estudos de

imunoproteômica, aplicadas em testes treponêmicos atuais para triagem de sífilis (Sato et al, 1999; Brinkman et al, 2006; McGill et al, 2010; Runina et al, 2018; Houston et al, 2023; Campo et al, 2024; Haynes et al, 2024). Também disponíveis em bancos de dados biológicos, como GenBank e/ou PDB.

Os epítomos foram preditos usando os algoritmos de Predição de Epítomos do Banco de Dados de Epítomos Imunológicos – do inglês: *Immune Epitope Database* (IEDB). Este servidor possui uma série de algoritmos que visam prever epítomos de células B. O algoritmo *Emini Surface Accessibility*, usado para identificar aminoácidos na sequência primária que são mais expostos na superfície da proteína (Emini et al., 1985), e o algoritmo *Bepipred Linear Epitope Prediction*, que prevê resíduos de superfície com maior probabilidade de serem reconhecidos por anticorpos, foram ambos aplicados. Os aminoácidos espacialmente próximos nas estruturas terciárias foram usados para projetar os peptídeos que mimetizassem a região epitópica, conforme descrito anteriormente (Machado-de-Ávila et al, 2014). Para obter as estruturas tridimensionais, a pesquisa de proteínas foi realizada selecionando o banco de dados Protein Data Bank (PDB), do qual foi selecionada a estrutura tridimensional com a melhor resolução. Na ausência da estrutura 3D, a modelagem molecular foi desenvolvida usando o programa *SwissModel* (Biasini et al, 2014). Epítomos conformacionais foram projetados pela combinação de aminoácidos de diferentes regiões proteicas, projetando-os nas estruturas 3D coletadas no PDB ou criadas por meio de modelagem estrutural (Waterhouse et al, 2018). O design de epítomos conformacionais foi realizado usando o SwissPDB-viewer (Guex; Peitsch, 1997; Scussel et al, 2022).

Os peptídeos finais foram avaliados pelo algoritmo de bioinformática BLAST-p para avaliar e comparar a similaridade entre as sequências de proteínas que induzem resposta imune no hospedeiro com proteínas de outras enfermidades que apresentam reações cruzadas, como os agentes etiológicos das treponematoses endêmicas: Bejel, pinta e boubá, que foram depositados em bancos de dados como o *GenBank*, e então foram alinhadas pelo programa *Clustal Omega* (Sievers et al, 2011).

3.3.2 Síntese química e caracterização de peptídeos

As sequências peptídicas de epítomos conformacionais foram sintetizadas manualmente pela técnica Fmoc *Solid Phase Peptide Synthesis*, conforme descrito anteriormente (Merrifield, 1969; Machado-de-Ávila et al, 2014; Scussel et al, 2022). Em seguida, esses peptídeos foram caracterizados por espectrometria de massa por eletrospray

usando um espectrômetro Xevo TQ-S micro–Triple Quadrupole acoplado a um sistema UPLC (Waters Corporation, Framingham, MA, EUA). As amostras de peptídeos foram diluídas em acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico e introduzidas por infusão no modo de ionização positiva, com fragmentação por colisão de argônio. Os espectros de massa foram analisados pelo software MassLynx versão V4.2 SCN1001 (2019, Waters Inc.). Os parâmetros físico-químicos dos peptídeos foram analisados usando Pepcalc e ExPASy - Compute pI/Mw (Scussel et al, 2022; De Oliveira et al, 2024) e a identidade dos peptídeos foi confirmada pelo perfil de fragmentação dos espectros de massa.

3.4 ELISA BASEADO EM PEPTÍDEOS

Os peptídeos sintéticos foram usados como antígenos para detecção de anticorpos específicos para sífilis por ELISA baseado em peptídeos (Scussel et al, 2022; De Oliveira et al, 2024) com algumas adaptações. Placas de 96 poços de EIA de alta ligação (Costar 3590, Corning) foram revestidas com 100 μL /poço de peptídeos (individualmente, 0,05 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) em tampão carbonato (pH 9,6) e incubadas a 4 °C *overnight*. As placas foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com uma solução bloqueadora de albumina sérica bovina (BSA) a 5% a 37 °C por 1 h. Após a lavagem, amostras de soro diluídas (1:100) em solução de 0,5% de BSA em PBS-T, foram adicionadas a cada poço (100 μL /poço) e incubadas a 37 °C por 1 h. Os poços foram lavados e incubados com IgA, IgM e IgG polivalentes anti-humanos conjugados com peroxidase (Sigma-Aldrich) a 37 °C por 1 h, na diluição ótima (1:5000), de acordo com testes de padronização anteriores. Após outra lavagem, a detecção colorimétrica foi realizada com o-fenilenodiamina (OPD) (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em tampão citrato, pH 5,2) com 3 μL de peróxido de hidrogênio ou com solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), e interrompida com ácido sulfúrico 2 M. A densidade óptica foi medida a 492 nm (OPD) ou 450 nm (TMB) pelo espectrofotômetro SpectraMax M3. Curvas de titulação preliminares foram realizadas para otimizar as concentrações de antígeno, amostra e conjugado. Para reduzir a variação analítica, os experimentos foram realizados usando amostras de soros com os mesmos reagentes (lotes, diluições, etc.). A robustez analítica foi garantida pela realização de dois ELISA, entre dois dias distintos, usando as mesmas amostras de soros testadas nos dois experimentos independentes para todos os peptídeos individualmente. Uma análise do gráfico de Bland-Altman (dados não mostrados) indicou que as diferenças nos valores de densidade óptica (OD) entre as duplicatas não aumentaram com a variação de sua

média sorológica. Assim, as análises de dados foram realizadas pela média sorológica de cada amostra de soro contra cada peptídeo como antígeno de revestimento em ELISA.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para análise dos dados para estudo de acurácia, o método de tabulação cruzada (tabela de contingência) e as estatísticas de acurácia foram determinadas usando o método de Análise de Curva *Receiver Operating Characteristics* (ROC). Os valores de corte (*cut-off*) para diferenciar amostras negativas e positivas contra cada antígeno foram determinados considerando a média das amostras de controle negativo (não infectadas) mais 2,5 DP (Desvio Padrão). Sensibilidade (Se), especificidade (Sp), acurácia - área sob a curva (AUC), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), razão de verossimilhança (LR) dos antígenos foram determinados a partir das curvas ROC com intervalos de confiança (IC) usando um nível de confiança de 95% (IC95%), para cada antígeno (Galvani et al, 2022; Scussel et al, 2022; De Oliveira et al, 2024).

Para validar a plataforma baseada em peptídeos como ferramenta de avaliação de eficácia no tratamento da sífilis, foram aplicados testes de normalidade, seguidos de testes de homogeneidade de variâncias, teste para avaliar significância das diferenças entre grupos e *post-hoc* para comparações múltiplas (Jerrold H. Zar, 2009). A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Em um dos grupos o teste de Shapiro-Wilk indicou $p < 0,001$, sugerindo violação significativa da normalidade. Desvios também foram observados no gráfico Q-Q (Figura 3), confirmando a não normalidade. O teste de Brown-Forsythe foi realizado para homogeneidade de variâncias entre os grupos, mais robusto para distribuições não normais e utiliza a mediana, tornando-o mais adequado para dados com assimetria. A análise de variância foi realizada pelo teste Welch's ANOVA. Para comparações múltiplas entre grupos experimentais, foi utilizado o teste T3 de Dunnett, apropriado para variâncias desiguais e diferentes tamanhos de amostra. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 10.4.1.

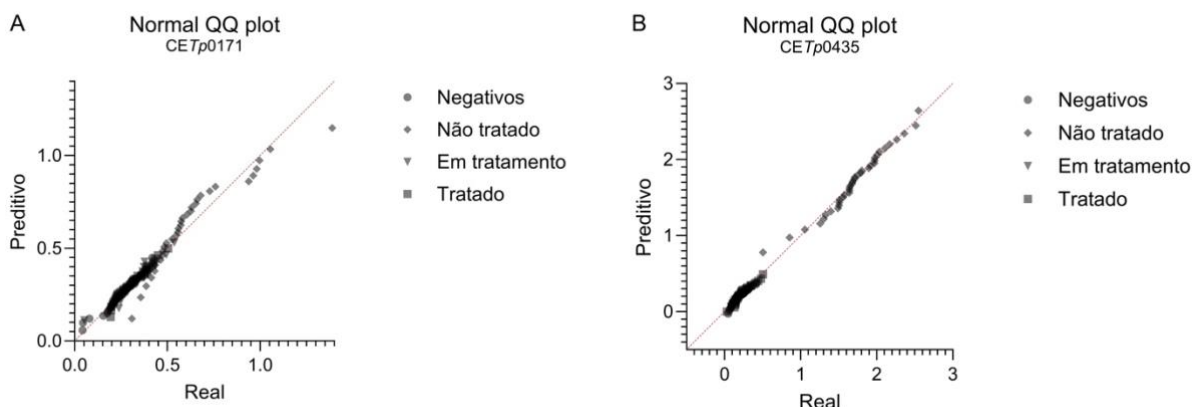


Figura 3 - Gráfico QQ Normal (Quantil-Quantil) de dados da vigilância da eficácia do tratamento da sífilis.

(A) Representação da distribuição dos dados do CETp0171 em relação à distribuição normal teórica. Enquanto (B) representa a distribuição dos dados do CETp0435 relativamente à distribuição normal teórica. Pode-se observar que, para a maioria dos grupos de ambos os peptídeos, (A) e (B), os pontos seguem a linha de referência, indicando aderência à normalidade. Entretanto, o grupo pré-tratamento apresentou desvios, confirmados pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p < 0,001$). Esses resultados justificam a aplicação de métodos estatísticos robustos para dados não normais, como o Brown-Forsythe seguido da ANOVA de Welch.

Fonte: Da autora, 2025.

4. RESULTADOS

4.1 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS PARTICIPANTES

A Tabela 1 resume as características sociodemográficas e clínicas dos participantes. Um total de 51,6% eram mulheres. Quanto à cor da pele, 51,2% se auto identificaram como pardos, seguidos de 24,8% brancos, 17,4% amarelos e 6,6% pretos. A maioria dos participantes era HIV-negativo (93,4%) e 63,9% testaram positivo para sífilis. Entre os diagnosticados com sífilis ($n=40$), sem tratamento, 67,5% estavam na fase latente, 17,5% na fase primária e 15,0% na fase secundária. Entre os diagnosticados com sífilis ($n=38$) 28,9% estavam em tratamento para sífilis no momento da coleta de dados, enquanto 71,1% haviam completado o tratamento. A média de idade dos participantes foi de 32,46 anos (DP = 11,42), esses dados não são apresentados em tabela.

Tabela 1 - Características clínicas e sociodemográficas dos participantes do estudo. Rio Verde, GO - Brasil, 2022/2023 ($n=122$).

VARIÁVEIS	n	%
Gênero		
Masculino	59	48,4
Feminino	63	51,6

Cor da pele		
Branca	30	24,8
Preta	8	6,6
Parda	62	51,2
Amarela	21	17,4
Status HIV		
Negativo	114	93,4
Positivo	8	6,6
Status sífilis		
Negativo	44	36,1
Positivo	78	63,9
Estágio da sífilis (pacientes sem tratamento)		
Primário	7	17,5
Secundário	6	15,0
Latente	27	67,5
Tratamento para sífilis		
Tratamento em andamento	11	28,9
Pós-tratamento (tratamento completo)	27	71,1

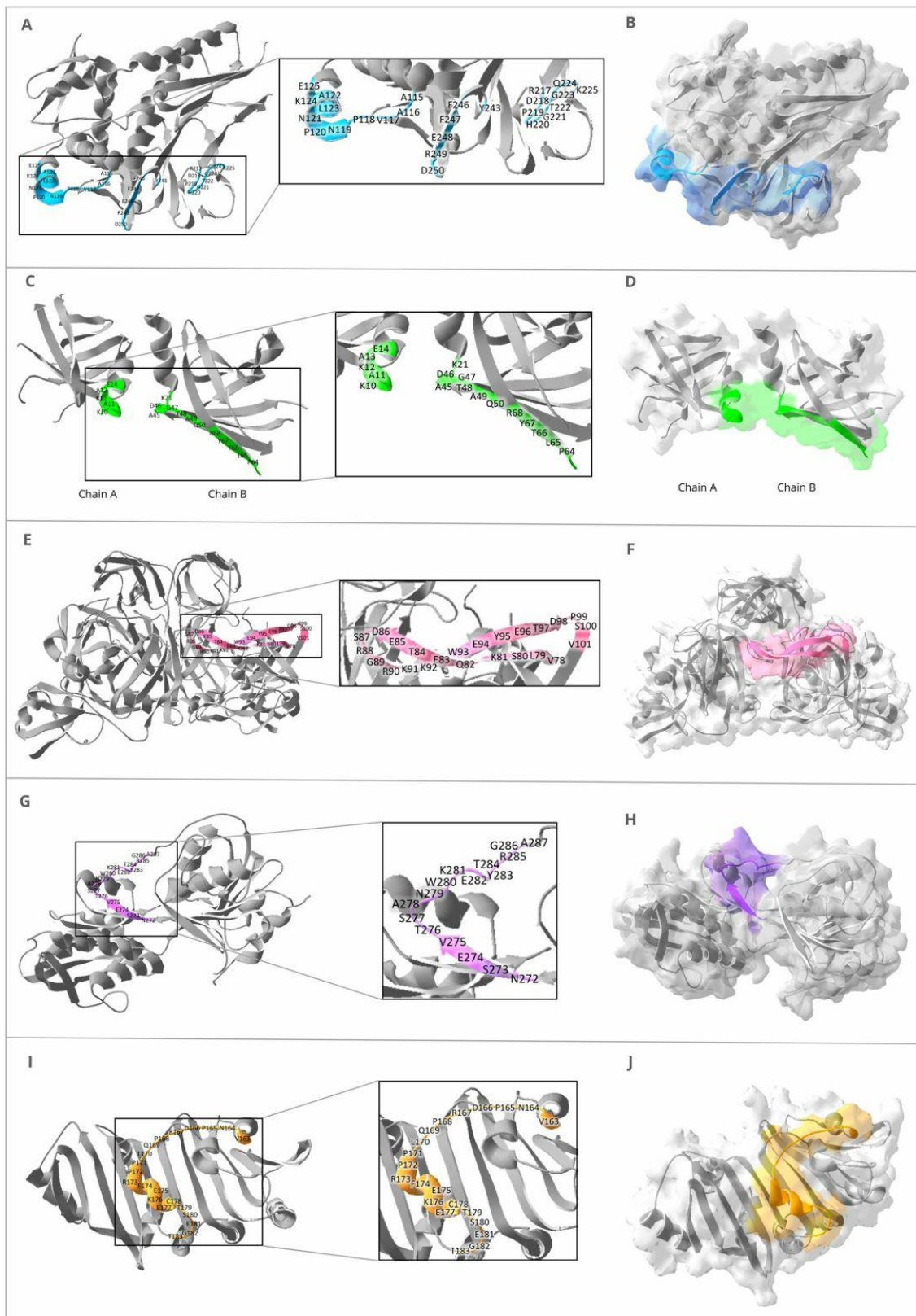
Fonte: Da autora, 2025.

4.2 VALIDAÇÃO DA PLATAFORMA DE SORODIAGNÓSTICO PARA SÍFILIS

4.2.1 Epítipo conformacional de antígenos proteicos treponêmicos

Os epítipos foram previstos por dois algoritmos diferentes do IEDB. Os resultados da previsão foram integrados e utilizados para conceber epítipos conformacionais dentro das estruturas tridimensionais utilizando o Swiss-PDB-Viewer. Para cada proteína, Tp0171 (PDB: 4XDU), Tp0435 (PDB: 4UQ3), Tp0574 (código GENBANK), Tp0453 (PDB: 5JX2) e Tp0684 (PDB: 3J8J), foi predito um epítipo-peptídeo conformacional, conforme ilustrado na Figura 4. Estes epítipos contêm uma combinação de aminoácidos de diferentes regiões de cada proteína. A Tabela 2 mostra a sequência de aminoácidos obtidos que imitam os epítipos conformacionais das proteínas imunogênicas de *T. pallidum* (CETp) e as propriedades físico-químicas dos seus peptídeos sintéticos.

Figura 4 - Epítipos conformacionais em proteínas *T. pallidum* em estruturas 3D.



O peptídeo CETp0171 está destacado em azul claro em diagrama de *fitas*(A) e na superfície molecular (B). O péptido CETp0435 está destacado a verde em diagrama de *fitas*(C) e na superfície molecular (D). O peptídeo CETp0574 está destacado a cor-de-rosa em representação de *fitas* (E) e na superfície molecular (F). O peptídeo CETp0684 está destacado em roxo em diagrama de *fitas* (G) e, e na superfície molecular (H). E, finalmente, o peptídeo CETp0453 está destacado em laranja em diagrama de *fitas* (I) e na superfície molecular (J) .

Fonte: Da autora, 2025.

Tabela 2 - Sequências dos epítomos conformacionais de acordo com a posição dos aminoácidos nas proteínas de *T. pallidum* e propriedades físico-químicas dos seus peptídeos sintéticos.

Peptídeo	Sequência do peptídeo na posição da proteína	Massa isotrópica (g/mol)	Ponto isoeletrico (pH)	Solubilidade em água
CE Tp0171	Lys ₂₂₅ Gln ₂₂₄ Gly ₂₂₃ Thr ₂₂₂ Gly ₂₂₁ His ₂₂₀ Pro ₂₁₉ Asp ₁₁₈ Arg ₂₁₇ Tyr ₂₄₃ Phe ₂₄₆ Phe ₂₄₇ Gln ₂₄₈ Arg ₂₄₉ Asp ₂₅₀ Ala ₁₁₅ Ala ₁₁₆ Val ₁₁₇ Pro ₁₁₈ Asp ₁₁₉ Pro ₁₂₀ Asp ₁₂₁ Ala ₁₂₂ Leu ₁₂₃ Lys ₁₂₄ Glu ₁₂₅	2956,27	9,70	Bom
CE Tp0435	Lys ₁₀ Ala ₁₁ Lys ₁₂ Ala ₁₃ Glu ₁₁₄ Lys ₂₁ Ala ₄₅ Asp ₄₆ Gly ₄₇ Thr ₄₈ Ala ₄₉ Gln ₅₀ Arg ₆₈ Tyr ₆₇ Thr ₆₆ Leu ₆₅ Pro ₆₄	1848,09	9,53	Bom
CE Tp0574	Val ₉₇ Leu ₉₈ Ser ₉₉ Lys ₁₀₀ Gln ₁₀₁ Glu ₁₀₂ Thr ₁₀₃ Glu ₁₀₄ Asp ₁₀₅ Ser ₁₀₆ Arg ₁₀₇ Gly ₁₀₈ Arg ₁₀₉ Lys ₁₁₀ Lys ₁₁₁ Trp ₁₁₂ Glu ₁₁₃ Tyr ₁₁₄ Glu ₁₁₅ Thr ₁₁₆ Asp ₁₁₇ Pro ₁₁₈ Ser ₁₁₉ Val ₁₂₀	2867,12	6,28	Bom
CE Tp0684	Asn ₂₇₂ Ser ₂₇₃ Glu ₂₇₄ Val ₂₇₅ Thr ₂₇₆ Ser ₂₇₇ Ala ₂₇₈ Asn ₂₇₉ Trp ₂₈₀ Lys ₂₈₁ Glu ₂₈₂ Tyr ₂₈₃ Thr ₂₈₄ Arg ₂₈₅ Gly ₂₈₆ Ala ₂₈₇	1812,91	6,14	Baixa
CE Tp0453	Val ₁₆₃ Asn ₁₆₄ Pro ₁₆₅ Asp ₁₆₆ Arg ₁₆₇ Pro ₁₆₈ Gln ₁₆₉ Leu ₁₇₀ Pro ₁₇₁ Pro ₁₇₂ Arg ₁₇₃ Phe ₁₇₄ Glu ₁₇₅ Lys ₁₇₆ Glu ₁₇₇ Cys ₁₇₈ Thr ₁₇₉ Ser ₁₈₀ Glu ₁₈₁ Gly ₁₈₂ Thr ₁₈₃	2400,65	4,87	Bom

Fonte: Da autora, 2025.

Após a síntese química dos peptídeos, estes foram caracterizados por espectrometria de massa para garantir a sua identidade através da razão massa/carga (m/z), confirmando a sua massa molecular através do padrão de fragmentação. O íon precursor foi fragmentado com argônio, e a confirmação das sequências de aminoácidos foi adquirida de acordo com o espectro do perfil de fragmentação. A massa monoisotópica e o padrão de fragmentação de cada peptídeo foram determinados utilizando a ferramenta Molecular Weight Calculator do software MassLynx, como se mostra no Apêndice B.

4.2.2 Validação do sorodiagnóstico utilizando peptídeos miméticos

Os testes de ELISA foram realizados para avaliar a detecção de anticorpos específicos contra peptídeos miméticos de epítomos conformacionais treponêmicos, utilizando amostras de soro de pacientes diagnosticados, mas não tratados (n = 40) comparados com os de doadores não infectados (n= 44), como controles negativos. Todos os peptídeos foram aplicados individualmente para detecção de IgM, IgA e IgG polivalentes. A área sob a curva ROC foi utilizada para avaliar o desempenho do diagnóstico de acurácia do ELISA baseado em peptídeos, analisando sua sensibilidade e especificidade. O valor da AUC indica a capacidade

do modelo de distinguir entre amostras positivas e negativas de sífilis, sendo que uma AUC próxima de 1 reflete uma excelente separabilidade ou uma precisão ótima. As curvas ROC para todos os ELISA com base em peptídeos são apresentadas na Figura 5, enquanto a Tabela 3 resume os valores de corte e os parâmetros ROC.

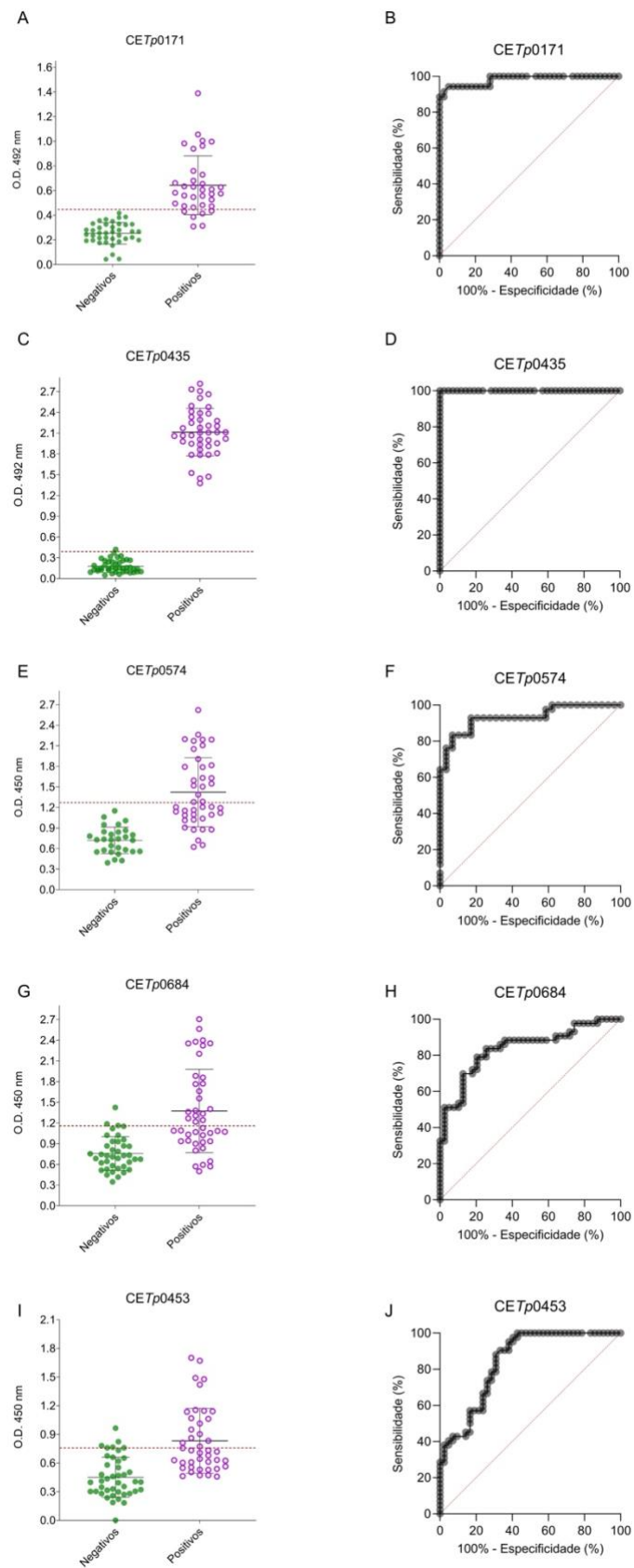


Figura 5- Reatividade sorológica utilizando peptídeos sintéticos como antígeno para o sorodiagnóstico da sífilis e respectiva curva ROC.

Antígeno (peptídeo) CETp0171 Reatividade serológica (A) e respectiva curva ROC (B); antígeno (peptídeo) CETp0435 Reatividade serológica (C) e respectiva curva ROC (D) antígeno (peptídeo) CETp0574 Reatividade serológica (E) e respectiva curva ROC (F); antígeno (peptídeo) CETp0684 Reatividade serológica (G) e respectiva curva ROC (H); e CETp0453 Reatividade serológica (I) e respectiva curva ROC (J). O conjugado polivalente foi diluído a 1:5000 em BSA 0,5% em PBS-T. Os pontos azuis claros representam os valores de densidade ótica para cada amostra negativa, e os vermelhos representam os valores de densidade ótica para cada amostra positiva. Estes valores foram utilizados para determinar as curvas ROC. Os valores de corte (linhas pontilhadas a preto) para amostras positivas (amostras de soro de sífilis (n=40)) e negativas (dadores não infectados (n=44)) foram determinados pela média das amostras de controlo negativo (não infectadas) mais 2,5 DP.

O CETp0171 e o CETp0435 foram capazes distinguir as amostras de soro de pacientes com sífilis positiva dos negativos, Figura 5A e 5C. Os valores de OD492 foram considerados positivos quando superiores à média de OD492 do controle negativo mais 2,5 DP. Os peptídeos CETp0171 e CETp0435 apresentaram um desempenho de diagnóstico ótimo, AUC = 0,98 e 1,00, respectivamente, atingindo uma especificidade de 92,31 e 97,62% e uma sensibilidade de 94,29 e 100%, respectivamente, diferenciando eficazmente entre amostras positivas e negativas (Figura 5A, 5B, 5C e 5D, Tabela 3). Estes resultados demonstraram que estes peptídeos tiveram o melhor desempenho de todos os avaliados. Por outro lado, o peptídeo CETp0574 obteve sensibilidade de 83,33% e especificidade superior a 90% (figura 5F e tabela 3), o que pode ser considerado uma ferramenta de diagnóstico satisfatória. O peptídeo CETp0684 apresentou valores de AUC $\geq 0,84$, com sensibilidade $\geq 80\%$ e especificidade $\geq 70\%$ (Figura 5H, Tabela 3). O peptídeo CETp0453 exibiu uma sensibilidade superior a 90%, também apresentou valores de AUC $\geq 0,84$, no entanto, a sua especificidade foi de aproximadamente 66% (Figura 5J e Tabela 3), limitando a sua capacidade de detectar com acurácia amostras positivas sem potencial de reatividade cruzada. Apesar destas melhorias desenvolvidas, estes peptídeos, CETp0574 (Figura 5E), CETp0684 (Figura 5G), CETp0453 (Figura 5I), não foram capazes de diferenciar completamente as amostras positivas das negativas.

Tabela 3 - Parâmetros da curva ROC para a deteção específica polivalente (IgA, IgM e IgG) utilizando o ELISA baseado em peptídeos como ferramenta de sorodiagnóstico da sífilis.

Antígeno	Parâmetros									
	AUC	IC 95%	Cut-off	Se (%)	IC 95%	Sp (%)	IC 95%	LR+	VPP	PVN
CETp0171	0,98	0,96 a 1,00	< 0,454	94,29	81,39 - 98,98	92,31	79,68 - 97,35	12,26	1,0	0,87
CETp0435	1,00	1,00 a 1,00	< 0,402	100,0	91,62 - 100,0	100,0	91,62 - 100,0	42,00	1,00	1,00
CETp0574	0,93	0,87 a 0,99	< 1,429	83,33	69,40 - 91,68	93,10	78,04 - 98,77	12,08	0,89	0,55
CETp0684	0,84	0,75 a 0,93	< 1,169	83,72	70,03 - 91,88	74,36	58,92 - 79,37	2,512	0,91	0,65
CETp0453	0,84	0,76 a 0,92	< 0,827	90,48	77,93 - 96,23	66,67	51,55 - 78,99	2,714	0,98	0,62

Amostras de soro de pacientes com sífilis (n = 41) e de indivíduos não infectados (n = 43) foram utilizadas no ELISA baseado em peptídeos. A análise estatística da curva ROC (Receiver Operating Characteristic), obtendo um valor de $p < 0,0001$, para determinar a exatidão através da Área Sob a Curva ROC (AUC), Sensibilidade (Se), Especificidade (Sp), com Intervalo de Confiança (IC 95%). O rácio de verosimilhança positiva (LR+) foi obtido

através da análise ROC pelo rácio da sensibilidade por 1 especificidade. Os valores preditivos positivos (VPP) e os valores preditivos negativos (VPN) foram obtidos pela correlação matemática, entre verdadeiros positivos e falsos positivos e por verdadeiros negativos e falsos negativos, respetivamente; usando o método padrão de tabela de contingência 2×2 .

Fonte: Da autora, 2025.

Com base na validação da análise ROC destes cinco antigênicos e considerando que a sífilis é uma IST crônica de estágios múltiplos, que progride através de estágios como primário, secundário e latente, as amostras também foram avaliadas pelos estágios clínicos de cada participante no momento da coleta da amostra. Neste sentido, o CETp0171 mostra-se como uma ferramenta satisfatória para detectar condições secundárias, e boa para detectar condições primárias e latentes (Figura 6A). Já a curva ROC apenas para amostras secundárias apresenta AUC= 1,0, e sensibilidade e especificidade de 100% (Figura 6C). Este peptídeo também apresenta AUC = 0,9856, sensibilidade de 87,50% e especificidade de 97,44% para o estágio primário (Figura 6B), e AUC = 0,9808, sensibilidade de 83,33% e especificidade de 97,44% (Figura 6D).

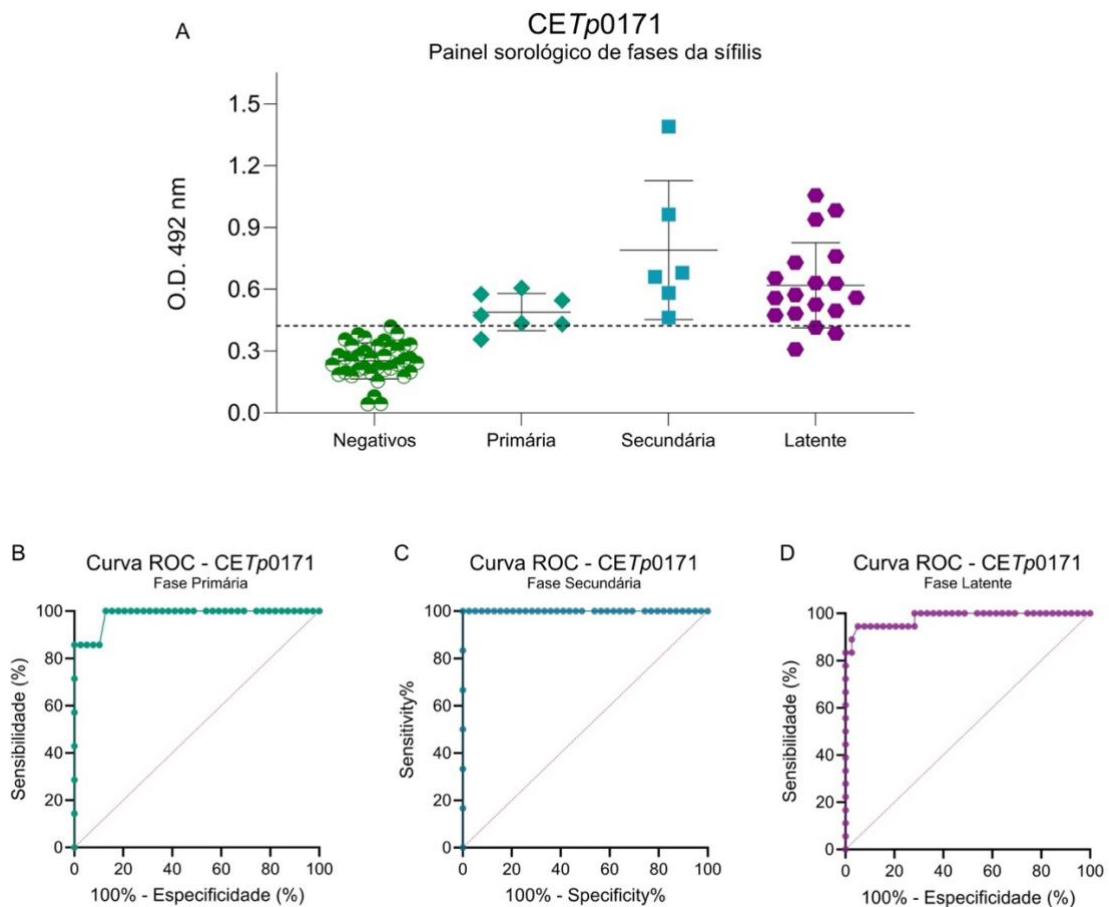


Figura 6 - Painel sorológico do estágio da sífilis utilizando o peptídeo CETp0171 como antígeno e suas respectivas curvas ROC.

Painel sorológico para sífilis utilizando CETp0171 em vários estágios (A), curva ROC do estágio primário (B), curva ROC do estágio secundário (C) e curva ROC do estágio latente (D). Os valores de corte (linhas pontilhadas a preto) para as amostras positivas (primária (n=7), secundária (n=6) e latente (n=27)) e negativas (dadores não infectados (n=44)) foram determinados pela média das amostras de controlo negativo (não infectadas) mais 2,5 DP.

Fonte: Da autora, 2025.

O CETp0435 demonstrou um desempenho superior, apresentando índices de elevada precisão na detecção de todos os estados de sífilis (Figura 7A). As curvas ROC para os estágios Primário (Figura 7B), Secundário (Figura 7C) e latente (Figura 7D) apresentam AUC= 1,0 e sensibilidade e especificidade de 100%.

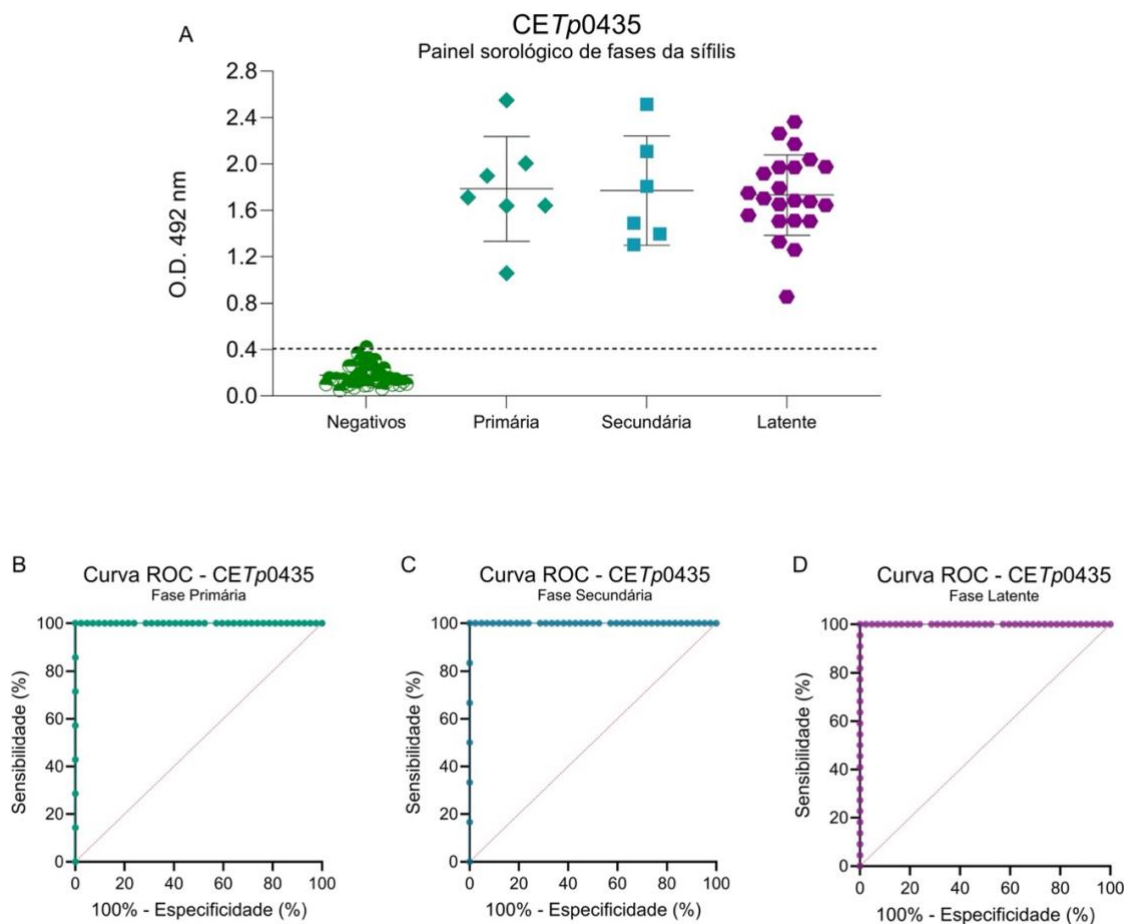


Figura 7 - Painel sorológico do estágio da sífilis utilizando o peptídeo CETp0435 como antígeno e respectivas curvas ROC.

Painel sorológico para sífilis utilizando CETp0435 em vários estágios (A), curva ROC do estágio primário (B), curva ROC do estágio secundário (C) e curva ROC do estágio latente (D). Os valores de corte (linhas pontilhadas a preto) para as amostras positivas (primária (n=7), secundária (n=6) e latente (n=27)) e negativas (dadores não infectados (n=44)) foram determinados pela média das amostras de controlo negativo (não infectadas) mais 2,5 DP.

Fonte: Da autora, 2025.

O CETp0574 não apresentou a capacidade de detectar verdadeiros positivos em todos os estágios da sífilis (Figura 8A). Apesar disso, a curva ROC para as amostras do estágio

primário apresentou uma AUC de 0,9754, com uma sensibilidade de 85,71% e uma especificidade de 100% (Figura 8B). Para a fase secundária, este peptídeo obteve uma AUC de 0,8666, com uma sensibilidade de 83,33% e uma especificidade de 96,55% (Figura 8C). Da mesma forma, para a fase latente, a AUC foi de 0,8726, com uma sensibilidade de 65,22% e uma especificidade de 96,55% (Figura 8D).

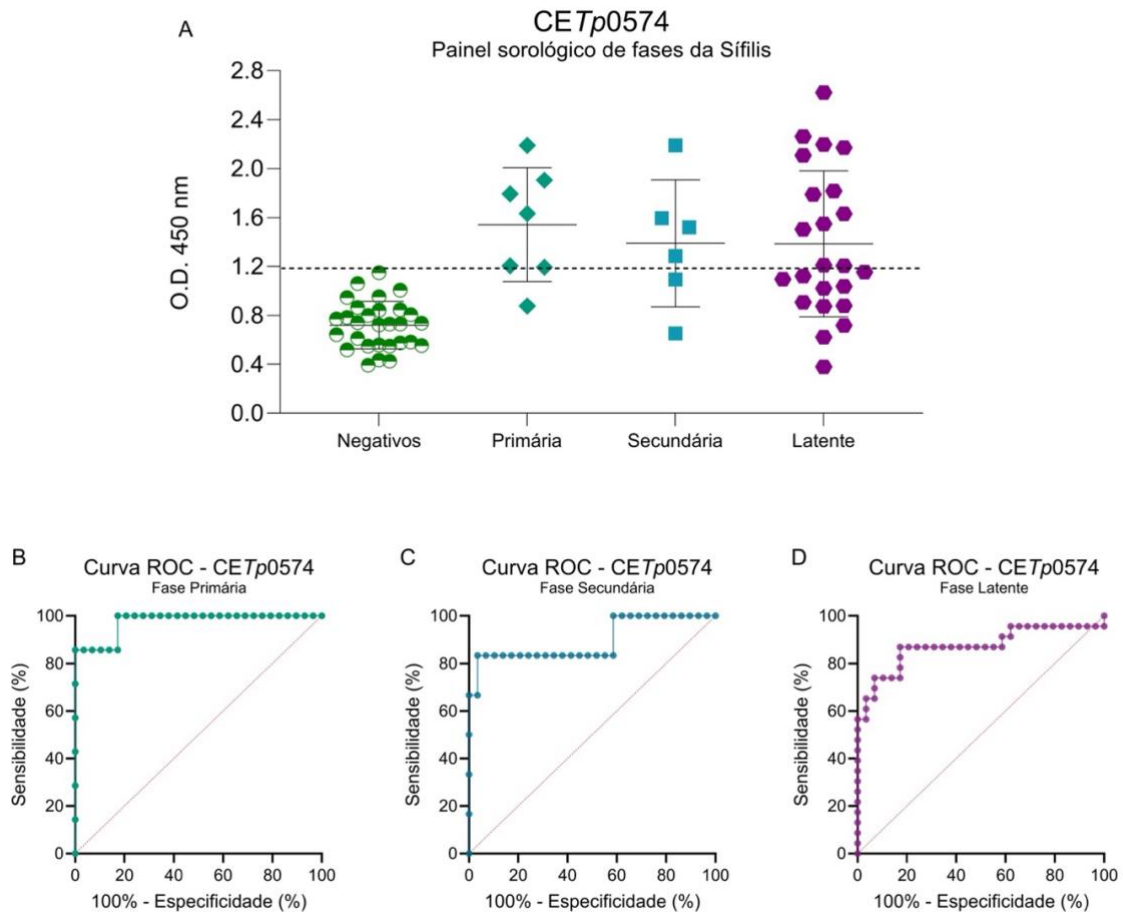


Figura 8 - Painel sorológico do estágio da sífilis utilizando o peptídeo CETp0574 como antígeno e respectivas curvas ROC.

Painel sorológico para sífilis utilizando CETp0574 em vários estágios da sífilis (A), curva ROC do estágio primário (B), curva ROC do estágio secundário (C) e curva ROC do estágio latente (D). Os valores de corte (linhas pontilhadas a preto) para as amostras positivas (primária (n=7), secundária (n=6) e latente (n=27)) e negativas (dadores não infectados (n=44)) foram determinados pela média das amostras de controlo negativo (não infectadas) mais 2,5 DP.

Fonte: Da autora, 2025.

O CETp0684 não distinguiu corretamente as amostras positivas em todas as fases da sífilis (Figura 9A). Sua curva ROC do estágio primário apresentou uma AUC de 0,9048, com sensibilidade de 71,43% e especificidade de 97,44% (Figura 9B). Em relação ao estágio secundário, esse peptídeo obteve uma AUC de 0,8333, com sensibilidade de 66,67% e

especificidade de 87,18% (Figura 9C). Da mesma forma, para o estágio latente, a AUC foi de 0,8310, mas com uma sensibilidade de 86,36% e uma especificidade de 79,49% (Figura 9D).

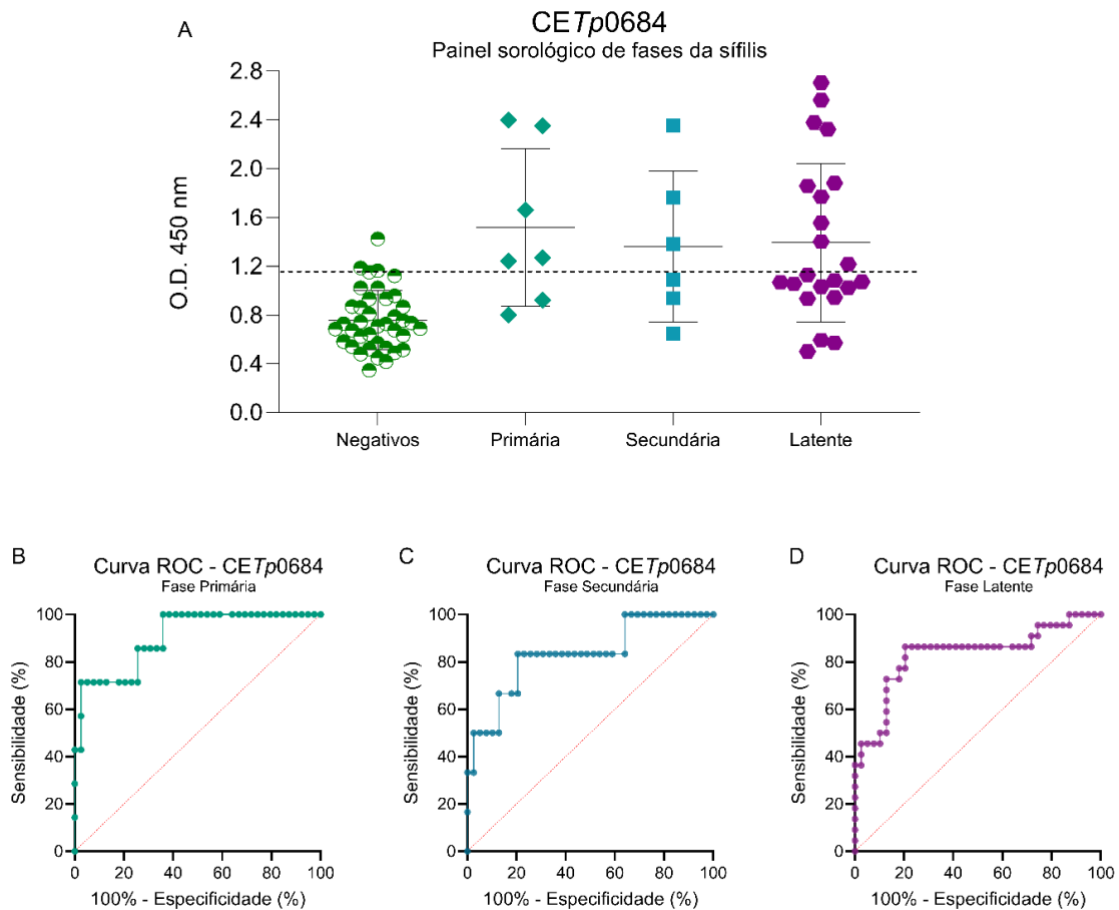


Figura 9 - Painel sorológico do estágio da sífilis utilizando o peptídeo CETp0684 como antígeno e respectivas curvas ROC.

Painel serológico para sífilis utilizando CETp0684 em vários estágios da sífilis (A), curva ROC do estágio primário (B), curva ROC do estágio secundário (C) e curva ROC do estágio latente (D). Os valores de corte (linhas pontilhadas a preto) para as amostras positivas (primária (n=7), secundária (n=6) e latente (n=27)) e negativas (doadores não infectados (n=44)) foram determinados pela média das amostras de controlo negativo (não infectadas) mais 2,5 DP.

Fonte: Da autora, 2025.

O CETp0453 demonstrou um desempenho inferior, apresentando erros de diagnóstico em todos os estágios da sífilis e baixa capacidade questionável para distinguir com exatidão as amostras positivas das negativas (Figura 10A). A curva ROC do CETp0453 do estágio primário apresentou uma AUC = 0,8968, com 66,67% de sensibilidade e 85,71% de especificidade (Figura 10B). Este peptídeo obteve uma AUC de 0,8730, com uma sensibilidade de 66,67% e uma especificidade de 80,95% para o estágio secundário (Figura 10C). O estágio latente apresentou o pior desempenho, com AUC = 0,7759, com uma sensibilidade de 69,57% e uma especificidade de 69,05% (Figura 10D).

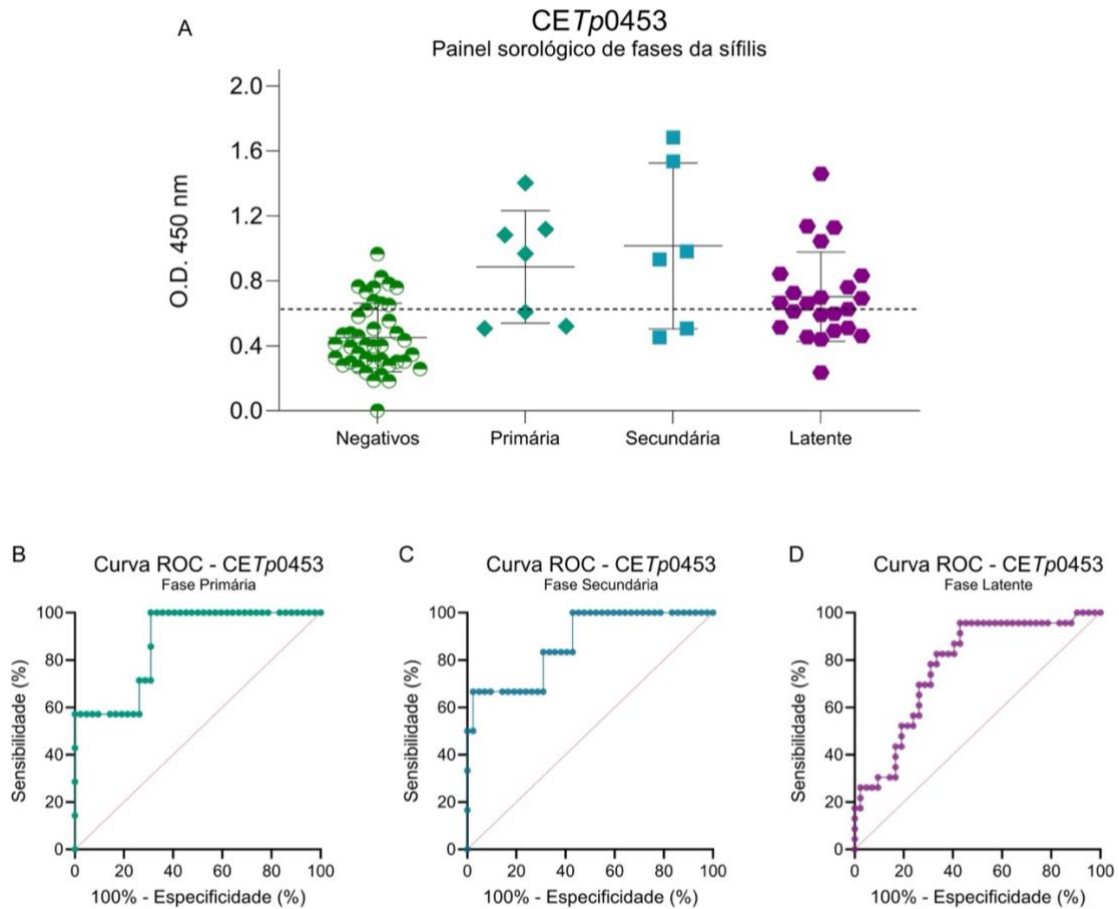


Figura 10 - Painel sorológico do estágio da sífilis utilizando o peptídeo *CETp0453* como antígeno e respectivas curvas ROC.

Painel sorológico para sífilis utilizando *CETp0453* em vários estágios da sífilis (A), curva ROC do estágio primário (B), curva ROC do estágio secundário (C) e curva ROC do estágio latente (D). Os valores de corte (linhas pontilhadas a preto) (A) para as amostras positivas (primária (n=7), secundária (n=6) e latente (n=27)) e negativas (doadores não infectados (n=43)) foram determinados pela média das amostras de controlo negativo (não infectadas) mais 2,5 DP.

Fonte: Da autora, 2025.

Como os peptídeos *CETp0171* e *CETp0435* apresentaram um desempenho de diagnóstico ótimo e ambos exibiram detecção precisa em todos os estágios da sífilis, estes foram utilizados para avaliar a plataforma baseada em peptídeos na vigilância da eficácia do tratamento da sífilis. Um total de 122 amostras de acompanhamento não pareadas foram coletadas de participantes classificados como não infectados (negativos) (n = 44), pré-tratamento (positivos) (n = 40), incluindo 7 com sífilis em estágio primário, 6 com sífilis em estágio secundário e 27 com sífilis latente; em tratamento contínuo (n = 11); e pós-tratamento (n = 27) (Tabela 1). Os níveis de anticorpos séricos contra *CETp0171* (Figura 11A) e *CETp0435* (Figura 11B), testados por ELISA baseado em peptídeos, foram significativamente mais elevados no pré-tratamento (não tratado) em comparação com o tratamento em curso e o pós-

tratamento (Figura 11, $p < 0,0001$). O grupo pré-tratamento apresentou níveis mais elevados ($p < 0,0001$) de anticorpos séricos contra CETp0171 (Figura 11A) e CETp0435 (Figura 11B), quando comparado com amostras negativas. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras negativas, em tratamento e pós-tratamento.

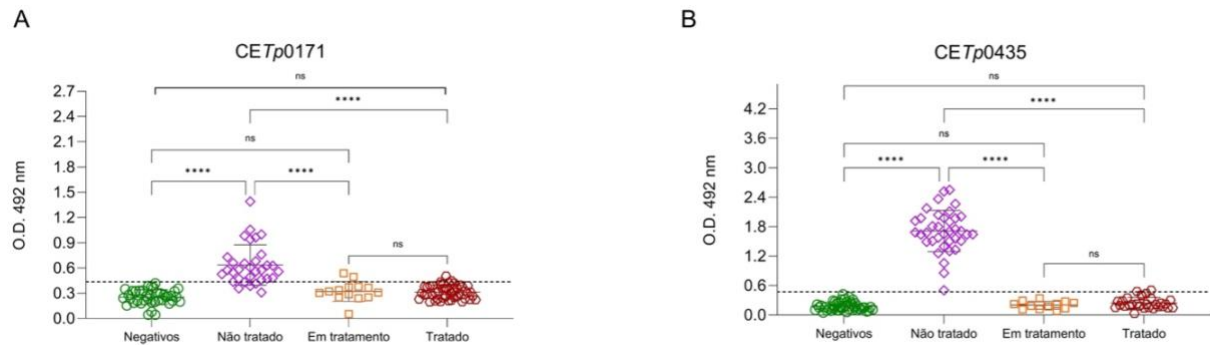


Figura 11- Monitoramento da eficácia da abordagem terapêutica da sífilis utilizando os níveis de anticorpos contra o CETp0171 (A) e o CETp0435 (B) ao longo das fases de tratamento.

Os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão (DP). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para as comparações entre os grupos, foi realizada a ANOVA de Welch, devido à violação da normalidade e homogeneidade das variâncias, conforme indicado pelo teste de Brown-Forsythe ($p < 0,0001$). As comparações múltiplas entre o grupo de controlo e os grupos experimentais foram realizadas utilizando o teste T3 de Dunnett, ajustando os valores de p para comparações múltiplas. As diferenças estatisticamente significativas são indicadas por asteriscos: **** $p \leq 0,0001$, ns significa diferença não estatisticamente significativa.

Fonte: Da autora, 2025.

5. DISCUSSÃO

As proteínas da membrana externa são os principais alvos da adesão do hospedeiro e da resposta imune (Sun et al, 2013). Estudos anteriores relataram que várias lipoproteínas da membrana interna de *T. pallidum*, como TP0171 (Tp15), TP0435 (Tp17), TP0574 (Tp47), TP0684 e TP0453 têm forte imunogenicidade, quando avaliadas contra soros humanos e soros de coelhos infectados (Brinkman et al, 2006; McGill et al, 2010; Campo et al, 2024;). Essas descobertas sugerem que essas lipoproteínas são os principais fatores de virulência e também são reconhecidas como antígenos de revestimento em testes sorodiológicos treponêmicos para sífilis. As proteínas Tp0171 (TpN15), Tp0435 (TpN17), Tp0574 (TpN47), Tp0684 e Tp0453 são nomeadas com base em seus respectivos códigos genéticos em *T. pallidum* (Frase et al, 1998). Cada proteína é identificada pelo prefixo Tp, indicando que se origina do *T. pallidum*, seguido por um número de gene específico. Essas proteínas de membrana externa (OMP) também são nomeadas por designações, como TpN15 ou Tp15 para Tp0171, devido à sua função genética putativa, como lipoproteína de 15 kDa; Tp0435 é uma lipoproteína de 17 kDa conhecida como TpN17 ou Tp17; Tp0574 é uma lipoproteína de 47 kDa projetada como

TpN47 ou Tp47 (Campo et al, 2024). Essas proteínas envolvem várias funções relacionadas à sobrevivência da bactéria, virulência e interações com o hospedeiro (Cox et al, 1992; Houston et al, 2023). Tp0684 e Tp0453 também fazem parte desse grupo, provavelmente desempenhando papéis em processos semelhantes (Sun et al, 2013).

O diagnóstico da sífilis apresenta limitações importantes, principalmente devido às manifestações clínicas que podem surgir nos diferentes estágios da doença, seguidos de períodos de latência onde os sintomas quase que desaparecem por completo. Embora os testes laboratoriais sejam bem padronizados, o diagnóstico ainda segue sendo bastante complexo, principalmente quando os resultados positivos dependem de análises de dados complementares como o histórico clínico e sexual do paciente. Esses obstáculos causam atraso no diagnóstico e atrasam o tratamento adequado do paciente, levando ao agravamento e, também, a propagação da doença (Cao et al, 2023).

A tecnologia embasada na construção de epítopos conformacionais preditos por bioinformática associado a síntese de moléculas peptídicas vem sendo amplamente estudados devido as suas vantagens, quando comparado aos epítopos lineares, pois permitem a combinação de regiões epitópicas mimetizando a conformação da região proteica na sua estrutura tridimensional, a mais vastamente encontrada nas reações antígeno-anticorpos. Essa característica potencializa a interação e afinidade com anticorpos específicos, que podem ser desenhados para redução de reações cruzadas e outras reações indesejadas. Ademais, este fato já foi verificado para peptídeos de epítopos em tecnologia semelhante anteriormente desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa, para o diagnóstico de COVID-19 e Leishmaniose (Scussel et al, 2022).

Através dessa tecnologia, na qual foram desenvolvidos peptídeos mimetizantes de epítopos conformacionais de proteínas expressas no processo de infecção da sífilis pelo *T. pallidum* (CETp), por meio de estudo de acurácia foi possível validar o desempenho diagnóstico destes peptídeos. Os resultados considerados de alta performance diagnóstica, com elevada acurácia, (AUC entre 1,0 e 0,9) e sensibilidade e especificidade acima de 90% foram os dos peptídeos CETp0171, CETp0435 e CETp0574. Além disso, o resultado obtido com a análise de perfil sorológico é semelhante aos encontrados em literatura. Estudos evidenciam a aplicação destas proteínas consideradas altamente imunogênicas em ensaio para detectar IgG específico frente a amostras de pacientes com sífilis, sendo as proteínas que apresentaram maior acurácia a Tp0171 (TP15) AUC = 0,971, Tp0435 (TP17) AUC = 0,992 e Tp0574 (TP47) AUC = 0,995 (4), corroborando com nossos resultados e evidenciando o potencial destes antígenos em detectar imunoglobulinas em fases não iniciais da doença.

No diagnóstico da sífilis, diversas proteínas vêm sendo amplamente estudadas, como o caso das proteínas de membrana externa da *T. pallidum* Tp45, Tp47 (Tp0574), Tp15 (Tp0171), e Tp17 (Tp0435). Segundo estudos de Sun et al. (2013), essas proteínas são potenciais biomarcadores no diagnóstico da sífilis. Cada uma dessas proteínas possui características específicas, sendo que os anticorpos contra essas proteínas, IgM e IgG, apresentam diferentes padrões de expressão em cada estágio da doença. Os anticorpos IgM contra Tp45 são mais prevalentes na sífilis primária, enquanto IgM Tp15 é detectado na fase terciária da doença. Os níveis de IgG contra as proteínas Tp0435 e Tp0574 são reduzidos após o tratamento para a doença, o que sugere que essas proteínas podem ser úteis no acompanhamento da sífilis. O peptídeo CETp0435 foi capaz de apresentar redução na detecção de anticorpos específicos em amostras de pacientes em tratamento ou após o tratamento (Figura 11B).

Um estudo prévio também demonstra que a resposta imunológica contra *T. pallidum* pode ser utilizada para avaliar a eficácia do tratamento. Ijsselmuiden et al. (1989) observaram que os níveis de anticorpos anti-TmpA, medidos por ELISA, diminuíram significativamente um ano após o tratamento com antibióticos. Da mesma forma, Sun et al. (2013) relataram a redução dos níveis de IgG anti-Tp0435 e IgG anti-Tp0574 após o tratamento, reforçando a hipótese de que a diminuição desses anticorpos pode indicar sucesso terapêutico.

O VDRL, atualmente é indispensável para monitorar o progresso do tratamento da sífilis e sendo recomendado de seis em seis meses até o final do segundo ano após o diagnóstico. Os títulos de anticorpos diminuem tipicamente quatro vezes após três meses e oito vezes após seis meses de tratamento. Para acompanhar eficazmente a resposta ao tratamento, é aconselhável utilizar o mesmo tipo de teste não treponêmico desde o diagnóstico até o teste de monitoramento final para avaliar se o título da amostra aumentada ou diminuída em comparação com o teste anterior do doente. Além disso, devido à variação metodológica inerente a uma diluição, apenas as alterações no título de pelo menos duas diluições devem ser consideradas clinicamente significativas para orientar as decisões de tratamento (Nadal; Framil, 2007; OMS, 2016; Brasil, 2022). Diante do exposto acima sugere-se que a plataforma diagnóstica desenvolvida neste estudo poderia ser aplicada juntamente com o VDRL para um melhor prognóstico de tratamento por meio da titulação de anticorpos, utilizando assim testes treponêmicos e não treponêmicos. Outrossim também com a aplicação dessa plataforma poderia-se amenizar a variabilidade metodológica inerente as diluições.

Haynes et al. (2024) afirmam que, nas últimas duas décadas, o acesso às sequências do genoma de *T. pallidum* facilitou a produção de antígenos recombinantes para diagnósticos.

Isso aprimorou a confiabilidade dos testes sorológicos, especialmente na detecção de lipoproteínas imunodominantes como Tp0435/TpN17, Tp0574/TpN47 e Tp0171/TpN15. Muitos testes treponêmicos aprovados pela FDA utilizam esses antígenos, apesar da dificuldade de obtenção devido à complexidade de propagação das espiroquetas. Embora os ensaios baseados em lipoproteínas recombinantes alcancem 95%-99% de sensibilidade e especificidade, ainda há desafios na identificação da doença em estágios iniciais e tardios (Silva et al, 2020; Silva et al, 2024). A sensibilidade pode ser aumentada com novos antígenos treponêmicos que complementem os alvos imunodominantes, justificando nossa escolha por novas proteínas e a necessidade de investigar melhor as já estudadas em pesquisas anteriores.

Uma triagem imune multiplex para a detecção da sífilis foi baseada na detecção específica de IgG com as proteínas recombinantes de *T. pallidum* Tp0171, Tp0435 e Tp0574, além das novas proteínas sintéticas Tp0684 e Tp0453, sendo realizada em 85 amostras de soro de indivíduos previamente diagnosticados com sífilis e 46 amostras de soro de doadores não infectados (Runina et al, 2018). Corroborando com os achados deste presente estudo, a eficiência diagnóstica do multiplex imune foi Tp0435 (93,6%) > Tp0171 (81,8%) > Tp0574 (74,8%). No entanto, Tp0684 apresentou 100% de especificidade e 16,9% de sensibilidade, enquanto os resultados do presente estudo demonstraram uma sensibilidade superior para o CETp0684 (83,72%), mas com menor especificidade (74,36%). De maneira geral, o peptídeo CETp0684 exibiu o melhor desempenho em termos de acurácia (0.84) quando comparado a Tp0684 (0.467). Tp0453 apresentou o melhor desempenho nessa plataforma multiplex imune, com 100% de especificidade e 97,5% de sensibilidade (Runina et al, 2018), porém, os resultados do presente estudo, evidenciam que o peptídeo CETp0453 demonstrou especificidade limitada (~66%).

Um estudo de Silva et al. (2020) e Zheng et al. (2023) afirmaram que a proteína Tp0574 do *T. pallidum*, uma lipoproteína de 47 kDa, é altamente imunogênica e essencial no sorodiagnóstico da sífilis. Frequentemente utilizada em testes sorológicos, como ELISA e testes rápidos, a Tp0574 é um dos principais antígenos reconhecidos pelo sistema imunológico durante a infecção. Além de sua importância no diagnóstico da sífilis, Tp0574 também pode ser útil para diferenciar estágios da doença e potencialmente outras treponematoses, como a boubá, embora mais estudos sejam necessários. Sua alta imunogenicidade e especificidade tornam Tp0574 um antígeno valioso para diagnóstico e pesquisas em vacinas contra *T. pallidum*, sendo assim assemelhando-se a presente pesquisa.

Já a proteína Tp0574 do *T. pallidum* de acordo com Zheng et al. (2023) e Dy et al. (2024) é a proteína mais abundantemente expressa específica do *T. pallidum*. Esta lipoproteína

apresenta papel funcional nas respostas inflamatórias e processos patológicos da sífilis, incluindo: promoção da angiogênese através da autofagia mediada por ERO, promoção da fagocitose em células HMC3 e promoção da migração e adesão de células THP-1 às células musculares lisas vasculares dérmicas humanas. Anticorpos contra Tp0574 são detectados no soro de pacientes em todos os estágios de desenvolvimento da sífilis, confirmando sua importância na patogênese e prevenção da doença. Essa proteína também induz a secreção de interleucina-6 (IL-6) em fibroblastos dérmicos humanos através da ativação de vias de sinalização como p38, PI3K/Akt (Proteína Kinase B (PKB), proteína serina-treonina cinase que desempenha um papel crucial em várias vias de sinalização celular, incluindo a regulação do metabolismo, crescimento celular, sobrevivência e proliferação) e NF- κ B. 4 (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells. É um complexo proteico que atua como um fator de transcrição, regulando a expressão de genes envolvidos na resposta imune, inflamação, crescimento celular e sobrevivência) (Manning; Toker, 2017). Achados do estudo de Zheng et al. (2023) contribuem para a compreensão da inflamação na sífilis e destacam o papel da Tp0574 na interação entre o *T. pallidum* e o sistema imunológico do hospedeiro corroborando com o presente estudo onde também foi confirmado a alta imunogenicidade da Tp0574.

Ainda sobre a Tp0574, estudos com ELISA mostraram que a proteína possui sensibilidade de 82,1% a 100% e especificidade de 100%, sugerindo a sua utilização na triagem da sífilis em laboratórios clínicos. Apesar dos autores terem produzido pesquisas em tempos diferentes, reportaram resultados semelhantes e mostraram elevada capacidade diagnóstica em virtude dos valores de área abaixo da curva (AUC) encontrados (Silva et al. 2020; Zheng et al. 2023) assemelhando-se com o presente estudo que também apresentou *cut-off* de 1,42, sensibilidade de 83,3% (IC 95%), especificidade de 93,1% (IC 95%) e acurácia de 0,93 (IC 95%).

Embora Dy, et al. (2024) não mencionem diretamente o potencial infeccioso da Tp0574, o estudo destaca que essa proteína desempenha um papel expressivo na evasão imunológica do *T. pallidum*. Ela inibe a fagocitose pelos macrófagos, dificultando a eliminação da bactéria pelo sistema imunológico, e induz a produção de prostaglandina E2 (PGE2) pelos macrófagos, o que suprime ainda mais a resposta imune. A Tp0574 ativa a via PERK/NF- κ B/COX-2 nos macrófagos, resultando na produção de PGE2 e inibição da fagocitose. Esses mecanismos contribuem para a habilidade do *T. pallidum* em evadir o sistema imunológico do hospedeiro, facilitando potencialmente a infecção e persistência da bactéria (Dy, et al., 2024).

Sendo assim, a proteína Tp0435, também conhecida como Tp17, é um dos antígenos mais reconhecidos por coelhos infectados com as estirpes Nichols e SS14 do *T.*

pallidum, provocando uma forte resposta de IgG no início da infecção e uma fraca resposta de IgM (Campo et al, 2024). Tp0435 é utilizado em testes treponêmicos baseados em proteínas recombinantes para o diagnóstico da sífilis (Silva et al, 2020; Haynes et al., 2024; Campo et al., 2024). O estudo de Campo et al., 2024, evidencia que Tp0435 é um antígeno promissor, sugerindo bom desempenho diagnóstico e afirmando que essa proteína pode ser um marcador sensível para testes de diagnóstico em humanos e isso contribui para a justificativa do presente estudo de introduzir a mesma proteína, Tp0435, como base para desenvolvimento de biomarcadores do estágio da sífilis.

Silva et al. (2020), Haynes et al. (2024) e Campo et al. (2024) corroboram com os resultados deste trabalho, destacando a importância do sorodiagnóstico com Tp0435 por também considerar como um dos antígenos imunodominantes de *T. pallidum* usados em testes treponêmicos para diagnóstico de sífilis, isso sugere que ele provoca uma forte resposta de anticorpos em indivíduos infectados. O estudo de Haynes et al. (2024) apresentou um antígeno imunodominante com reatividade significativa em diferentes estágios da sífilis, além disso, a reatividade ao Tp0435 diminuiu significativamente após o tratamento, indicando seu potencial como marcador para monitorar a resposta ao tratamento, sendo assim, esses resultados sugerem que a Tp0435 pode ser útil na detecção precoce da sífilis e no monitoramento da resposta ao tratamento, corroborando com nossos resultados com o peptídeo CETp0435 que também foi capaz de apresentar uma das melhores reatividade nos testes e apresentando níveis de sensibilidade e especificidade entre $\geq 97,62$ e $\geq 100\%$.

Baughn et al (1996) elucida que a Tp0171 exibe vários epítomos contínuos que são reconhecidos pelos anticorpos IgM e IgG presentes no soro de indivíduos diagnosticados com sífilis. As investigações sobre o mapeamento de epítomos delinearam regiões essenciais da proteína que são críticas para o reconhecimento imunológico, o que tem implicações significativas para o avanço de ensaios diagnósticos simples e economicamente viáveis para a sífilis. Sun et al., (2009) evidencia que Tp0171, em conjunto com outras proteínas como a Tp0435 e a Tp0574, foi utilizada para desenvolver testes ELISA altamente sensíveis e específicos. Um ELISA baseado numa proteína de fusão TpN0171-0435-0574 apresentou uma taxa de positividade de 99,5% em amostras de pacientes com sífilis, superando os métodos tradicionais como o TPHA e o TRUST (Sun et al., 2009). Sun Ran et al. (2013) relata que a ocorrência de anticorpos contra a Tp0171 varia de acordo com o estágio da sífilis. Os anticorpos IgM dirigidos à Tp0171 só foram identificados nas fases terciárias da infecção, enquanto os anticorpos IgG contra a Tp0171 foram mais frequentemente encontrados nas fases secundárias. Após o tratamento, observou-se uma diminuição notável dos níveis de IgG, mostrando a

eficácia da Tp0171 como indicador para avaliar a resposta ao tratamento, assim como o CETp0171 apresentou resultados semelhantes (Figura 11A)

Os resultados do presente estudo, com peptídeo mimetizante de epítipo da Tp0171, CETp0171, alinham-se com os dados da literatura sobre a aplicação da Tp0171 em sorodiagnóstico, evidenciando seu papel expressivo no desenvolvimento de métodos sorológicos para o diagnóstico da sífilis, oferecendo alta sensibilidade e especificidade, especialmente quando utilizada em combinação com outros antígenos.

Wang; Zhang (2024) efetuaram uma revisão da ultraestrutura da *T. pallidum* e registraram avanços inovadores nos últimos anos, incluindo a cultura *in vitro* de *T. pallidum* a longo prazo e melhorias na tecnologia de sequenciação de genes e na microscopia eletrônica. Esta revisão resume os progressos realizados na investigação da ultraestrutura da *T. pallidum*. Ao longo dos anos, foram identificados diversos antígenos altamente imunogênicos na membrana interna do *T. pallidum*. Esses antígenos desencadeiam respostas robustas de anticorpos durante a infecção, sem reatividade cruzada com outras doenças treponêmicas. Entre esses antígenos, Tp0171, Tp0435 e Tp0574 são considerados componentes essenciais.

Ainda no estudo de Wang; Zhang (2024) a Tp0171 apresenta uma forte imunogenicidade, desencadeando respostas elevadas de anticorpos em todas as fases da infecção por sífilis sem reatividade cruzada com soros de pacientes com outras doenças treponêmicas. Serve como um novo alvo para detecção de anticorpos específicos de sífilis. A Tp0171, uma proteína abundante na membrana interna, demonstra uma imunogenicidade e imunorreatividade potentes. A Tp0574 é encontrada por quatro domínios diferentes: dois domínios N-terminais complexos contendo folhas β e dois domínios C-terminais com dobras semelhantes a imunoglobulinas. Sendo a proteína específica de *T. pallidum* mais abundantemente expressa, a Tp0574 é altamente imunogênica. Além disso, a Tp0574 promove angiogênese através da autofagia causada por ERO, e esta angiogênese patológica pode desempenhar um papel importante na ajuda ao *T. pallidum* para romper os vasos sanguíneos e entrar no sangue para disseminação (Dy, et al., 2024).

No estudo de Hazlet et. al. (2005) descrevem que a proteína Tp0453 desempenha um papel importante no *T. pallidum* devido ao seu impacto significativo na permeabilidade da membrana externa do agente patogênico. Esta proteína facilita o transporte de nutrientes através da membrana externa, o que é vital para a sobrevivência das bactérias, especialmente dada a sua dependência de nutrientes fornecidos pelo hospedeiro. Além disso, o Tp0453 ajuda na evasão imunológica de bactérias ao não se expor na superfície da membrana, permanecendo assim inacessível aos anticorpos. Esta característica ajuda o *T. pallidum* a evitar a detecção e a

resposta do sistema imunitário do hospedeiro, permitindo infecções persistentes e de longa duração. A Tp0453 é uma lipoproteína que apresenta um polipeptídeo anfifílico com múltiplas hélices α anfipáticas que se inserem na membrana. Ao contrário de outras proteínas integrais da membrana externa, não possui uma estrutura de folha β extensa. Estas hélices anfipáticas permitem que a proteína se incorpore na bicamada lipídica, desestabilizando-a e aumentando a sua permeabilidade, enquanto permanece inacessível às proteínas. A detecção de anticorpos específicos contra Tp0453 serve como indicador sensível e específico de infecção por *T. pallidum*, ajudando no diagnóstico sorológico de sífilis. Estas características fazem do Tp0453 uma proteína distinta e funcionalmente vital para a sobrevivência e patogenicidade do *T. pallidum*. Sendo assim, a Tp0453 desempenha relevância no sorodiagnóstico (Sun et al, 2013). Entretanto, apesar da importância estrutural, funcional, e imunogênica da Tp0453, o peptídeo CETp0453 apresentou os piores resultados no presente estudo, mostrando especificidade limitada (~66%), e relativa baixa AUC.

A proteína Tp0684 (Tp38) desempenha um papel vital na sobrevivência e patogenicidade da *T. pallidum*. Como proteína de ligação à glucose e parte de um transportador ABC, a Tp0684 é essencial para a importação de glucose, que serve como fonte primária de energia para a bactéria (Brautigam et al, 2016). De acordo com o estudo de Queiroz (2019), a proteína Tp0684 demonstrou ser antigênica, uma vez que é reconhecida por soros de pacientes com sífilis primária e latente. Este fato sugere que o Tp0684 tem potencial para ser utilizado no desenvolvimento de testes sorológicos para o rastreio de pacientes com sífilis. O que fomenta os resultados encontrados neste estudo para o peptídeo CETp0684. Entretanto este peptídeo, assim como os estudos com as proteínas recombinantes Tp0684, exibem certas limitações de sensibilidade e especificidade.

Com base nas descrições acima, pode-se observar que as lipoproteínas utilizadas neste estudo são significativas para o sorodiagnóstico da sífilis. Além disso, o uso de peptídeos nos testes mostrou-se mais promissor em termos de tempo, eficácia e custo-benefício.

Os peptídeos sintéticos podem ser projetados para incluir epítomos específicos que são reconhecidos por anticorpos gerados em resposta à infecção por *T. pallidum*. Isso pode resultar em uma maior especificidade e sensibilidade nos testes sorológicos, reduzindo a reatividade cruzada com outros patógenos (Silva et al, 2020; Silva et al, 2024). A síntese de peptídeos é geralmente mais simples e menos custosa do que a produção de proteínas recombinantes completas. Isso facilita a padronização dos testes, permitindo a criação de kits diagnósticos que podem ser facilmente replicados. São mais fáceis de sintetizar e purificar em comparação com proteínas inteiras. Isso permite uma rápida adaptação às necessidades do

diagnóstico, como a inclusão de novos epítomos conforme necessário. Peptídeos tendem a ter uma menor imunogenicidade indesejada em comparação com proteínas completas, o que significa que eles podem induzir uma resposta imune mais controlada e específica, minimizando reações adversas em pacientes (Paiva, 2016; Lage, 2016; Silva et al, 2020; Folgosi, 2023; Silva et al, 2024).

Quando um teste diagnóstico exige um tempo de resposta curto, como no caso de *T. pallidum*, o uso de proteínas recombinantes pode ser inviável devido ao alto custo e à demora na obtenção dos resultados. Os peptídeos sintéticos surgem como uma alternativa mais acessível e eficiente, pois podem ser produzidos quimicamente ou expressos em sistemas celulares simples, reduzindo despesas e permitindo a formulação de misturas antigênicas personalizadas para aumentar a sensibilidade do teste. Além de seu potencial no sorodiagnóstico, os peptídeos podem ser aplicados em imunoenaios para diversas condições, incluindo infecções humanas e animais, bem como na prevenção e tratamento de doenças infecciosas, autoimunes, alérgicas e neoplásicas, devido à sua capacidade de conter epítomos reconhecidos pelas células T e contribuir para processos de recuperação e reparação celular (Paiva, 2016; Silva, 2020; Folgosi, 2023; Oliveira, 2024; Silva et al, 2024).

A produção de proteínas recombinantes para diagnóstico enfrenta desafios como baixo rendimento, complexidade na purificação e altos custos. A expressão dessas proteínas pode resultar em inclusões insolúveis, dificultando sua recuperação e exigindo estratégias de otimização. Além disso, sua utilização pode gerar reações cruzadas, comprometendo a especificidade dos testes (Rozendo et al, 2014; Meneses et al, 2015; Lanna et al, 2015).

A produção de proteínas recombinantes para diagnóstico enfrenta desafios como baixo rendimento, complexidade na purificação e altos custos. Além disso, sua utilização pode gerar reações cruzadas, comprometendo a especificidade dos testes (Rozendo et al, 2014; Meneses et al, 2015; Lanna et al, 2015). Diante dessas limitações, a busca por metodologias alternativas tem se intensificado, especialmente no diagnóstico de infecções como a sífilis. Os testes tradicionais para sífilis apresentam limitações significativas. Os não treponêmicos (VDRL, RPR) possuem alta sensibilidade na fase secundária (99%), mas baixa especificidade, resultando em falso-positivos. Já os treponêmicos (FTA-ABS, TPHA) possuem alta especificidade (96%-99%), mas não diferenciam infecções ativas de passadas, pois os anticorpos treponêmicos persistem mesmo após o tratamento (Brasil, 2016). Além disso, testes que detectam apenas IgM específico não são recomendados devido à baixa sensibilidade (50%) e à presença desse anticorpo em fases tardias da doença, o que compromete sua utilidade

diagnóstica (WHO, 2013; Procop et al, 2017; Peeling et al, 2017; Forrestel et al, 2020; Gaspar et al, 2021; Zhang et al, 2022; Silva et al, 2024).

Nesse contexto, os peptídeos surgem como uma alternativa promissora para o sorodiagnóstico da sífilis, permitindo o desenvolvimento de ensaios com maior especificidade e menor incidência de falso-positivos ao detectar anticorpos específicos contra epítomos do *T. pallidum* (Silva et al, 2024). A necessidade de novas plataformas diagnósticas reforça a relevância dessas estratégias, especialmente para aprimorar a precisão dos testes e sua aplicabilidade no monitoramento da infecção.

Os resultados de Silva et al, 2024 corroboram com os resultados deste presente estudo, dos quais são bastantes significativos e promissores para a utilização em sorodiagnósticos de sífilis, como por exemplo os nossos peptídeos, principalmente o CETp0171 e CETp0435 que apresentaram um desempenho de diagnóstico ótimo, $AUC = 0,98$ e $1,00$, respectivamente, atingindo uma especificidade de $92,31$ e $97,62\%$ e uma sensibilidade de $94,29$ e 100% , respectivamente, diferenciando eficazmente entre amostras positivas e negativas. Estes resultados demonstraram que estes peptídeos tiveram o melhor desempenho de todos os avaliados. Por outro lado, o peptídeo CETp0574 recebeu uma sensibilidade de $83,33\%$ e uma especificidade superior a 90% , o que pode ser considerado uma ferramenta de diagnóstico satisfatória. O peptídeo CETp0684 apresentou valores de $AUC \geq 0,84$, com sensibilidade $\geq 80\%$ e especificidade $\geq 70\%$. O peptídeo CETp0453 exibiu uma sensibilidade superior a 90% , também apresentou valores de $AUC \geq 0,84$, no entanto, a sua especificidade foi de aproximadamente 66% , limitando a sua capacidade de detectar com precisão amostras positivas sem potencial de reatividade cruzada. Apesar destas melhorias desenvolvidas, estes peptídeos, CETp0574, CETp0684, CETp0453, não foram capazes de diferenciar completamente as amostras positivas das negativas.

Na investigação conduzida por Ke et al. (2024), foi desenvolvido um teste LISA para identificar IgG específica para Tp0171, Tp0435 e Tp0574. O estudo também avaliou a eficácia do teste no diagnóstico da sífilis e no monitoramento das alterações dos níveis de anticorpos após o tratamento em modelos de coelhos infectados com *T. pallidum* e em doentes com sífilis. A plataforma LISA demonstrou um desempenho excepcional ($AUC > 0,95$) no diagnóstico da sífilis utilizando os três antígenos específicos do *T. pallidum*: Tp0171, Tp0435 e Tp0574. O LISA-Tp0435 e o LISA-Tp0574 apresentaram uma sensibilidade notavelmente mais elevada em comparação com o LISA-Tp0171, indicando o seu potencial significativo para o diagnóstico da sífilis. Em particular, os peptídeos CETp0171 e CETp0435 se destacaram com desempenhos diagnósticos excepcionais, com valores de AUC de $0,98$ e $1,00$, respectivamente,

além de alta sensibilidade (94,29% e 100%) e especificidade (92,31% e 97,62%). Esses resultados superaram os obtidos por Ke et al. (2024) para os antígenos Tp0171 e Tp0435, que também apresentaram sensibilidade e especificidade elevadas, mas não atingiram o nível de desempenho dos peptídeos CETp0171 e CETp0435. A combinação de elevada sensibilidade e especificidade desses peptídeos sugere seu grande potencial para aprimorar a precisão do diagnóstico da sífilis, destacando-os como alternativas promissoras frente aos testes tradicionais.

Em contraste, o peptídeo CETp0574 apresentou desempenho moderado, com sensibilidade de 83,33% e especificidade superior a 90%. Embora considerado uma ferramenta diagnóstica satisfatória, seu desempenho não alcançou a excelência dos peptídeos CETp0171 e CETp0435. Essa diferença de desempenho está alinhada com os resultados obtidos por Ke et al. (2024) para o antígeno Tp0574, que também demonstrou boa sensibilidade e especificidade, mas com algumas reações cruzadas. Além disso, os peptídeos CETp0684 e CETp0453 apresentaram sensibilidade e especificidade superiores a 80% e $AUC \geq 0,84$, mas com limitações na capacidade de distinguir com precisão amostras positivas das negativas. Essa limitação sugere a necessidade de mais otimizações desses peptídeos para melhorar sua performance diagnóstica. O desempenho do CETp0453, com sensibilidade superior a 90%, mas especificidade de aproximadamente 66%.

Dentre os antígenos estudados, Tp0435 se destaca pelo alto desempenho diagnóstico. Sua sensibilidade variou entre 83,3% e 94,8%, com os maiores valores observados na fase secundária da sífilis (94,8%). A especificidade manteve-se elevada (100%) em todas as fases clínicas, demonstrando ausência de reatividade cruzada com amostras não infectadas (Silva et al, 2020). Corroborado com os achados deste presente estudo, no qual o peptídeo CETp0435 especificidade de 100%. Entretanto, nos estudos utilizando a proteína recombinante, apesar de sua robustez diagnóstica, algumas reações cruzadas com doenças como a doença de Chagas e hepatites virais foram detectadas, embora em uma fração reduzida das amostras testadas (Silva et al, 2020; Silva et al, 2024). Todavia, o o peptídeo CETp0435 apresenta sensibilidade e especificidade de 100%, evidenciando a ausência de falsos negativos ou falsos positivos, o que pode ser atribuído a utilização de uma região altamente específica (epítipo conformacional). Avaliação com pacientes com outros IST, e doenças infecciosas aumentaria o potencial da plataforma desenvolvida no presente estudo.

Ainda, cabe salientar que esta diferença de resultados pode ser atribuída a sensibilidade do Tp0435 podendo variar conforme o método de detecção empregado. Zhang et al. (2002) relataram 90,9% de sensibilidade para o ELISA baseado nesse antígeno, enquanto

Ke et al. (2024) indicaram uma sensibilidade de 96,9% quando utilizado em ensaios LISA. Entretanto, a plataforma com peptídeos se mostra mais eficaz, uma vez que utiliza o mesmo método ELISA, com com antígeno sendo peptídeos sintéticos. Outros estudos reportaram valores entre 85,3% e 97,1% para ELISA, com especificidade variando de 96,4% a 99%, atingindo 100% quando Tp0435 foi combinado com outros antígenos (Sun et al, 2009; Jie et al, 2010). Esses achados reforçam o potencial do Tp0435 como um marcador confiável para imunoenaios no diagnóstico da sífilis, e que antígenos peptídicos tem potencial de melhorar os parâmetros de acurácia dos testes sorodignósticos.

Considerando o impacto significativo de diagnósticos incorretos nos resultados dos pacientes e a dependência crítica de intervenções terapêuticas na precisão diagnóstica, esta plataforma de diagnóstico foi avaliada por meio de um estudo transversal de acurácia diagnóstica. O estudo de acurácia permitiu avaliar a capacidade do teste de índice de classificar corretamente os participantes do estudo como portadores de sífilis ou não, e de prever corretamente o evento ou condição, ou seja, presença ou ausência de infecção, no futuro (Chassé; Fergusson, 2019). Um dos principais desafios no desenvolvimento de ferramentas sorológicas é atingir alto desempenho analítico com amostras biológicas complexas, como o soro do paciente, que contém inúmeras proteínas que podem interferir no ensaio. Este estudo atingiu um Nível de Maturidade Tecnológica (TRL) de 5–6, como plataforma de diagnóstico protótipo usando cinco peptídeos derivados de epítomos conformacionais de proteínas altamente imunogênicas da *T. pallidum* foram testados usando um biobanco de 122 amostras de soro humano simulando um ambiente relevante (Arnouts et al, 2022). O desenvolvimento contínuo desta plataforma pode posicioná-la como uma inovação fundamental nos esforços globais de controle da sífilis, promovendo a acessibilidade e a equidade na assistência à saúde, em alinhamento com o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 3 (ODS 3), que visa garantir vidas saudáveis e promover o bem-estar para todos, em todas as idades (United Nations, 2015).

Este estudo apresenta algumas limitações. Todos os ELISA de CETp0171 e CETp0435 foram realizados com o-fenilenodiamina (OPD) como reagente de detecção, enquanto CETp0574, CETp0684 e CETp0453 foram realizados com tetrametilbenzidina (TMB) como reagente de detecção. Essa mudança no reagente de detecção de ELISA pode ter potencialmente impactando os resultados de desempenho do peptídeo, uma vez que principalmente a lipoproteína Tp0574 é relatada como um antígeno chave para o sorodiagnóstico de sífilis, mas o peptídeo mimetizante não apresentou resultados tão próximos da proteína recombinante (Sun et al, 2009; Zheng et al, 2023). Já é relatado que TMB exibe maior sensibilidade do que OPD, produzindo o sinal mais alto. No entanto, apesar de sua ampla

aplicação na detecção de enzimas semelhantes à peroxidase, TMB apresenta uma limitação crítica: sua falta de especificidade, o que pode complicar o controle de sinais de fundo não específicos em amostras negativas (Wang, 2024). Caso contrário, tanto os substratos TMB quanto OPD demonstrariam desempenho analítico superior em termos de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), faixa dinâmica e sensibilidade (Vasquez-Alvarado et al, 2023). O tamanho da amostra para os estágios primário ($n = 7$) e secundário ($n = 6$) e a ausência de pacientes no estágio latente tardio, limitam a generalização dos achados em todos os estágios da sífilis. O tamanho limitado da amostra de pacientes co-infectados por HIV pode ter influenciado os achados, pois impediu análises específicas para determinar o impacto potencial da coinfeção nos resultados diagnósticos da sífilis. Esses fatores devem ser abordados em estudos futuros para aumentar a robustez e a aplicabilidade da plataforma-protótipo de diagnóstico. Além disso, estudos futuros são necessários para investigar a coinfeção pelo HIV na plataforma de protótipo de diagnóstico testada no presente estudo.

6. CONCLUSÕES

A bioinformática aplicada à identificação de epítomos conformacionais provou ser uma ferramenta útil para orientar o desenvolvimento de antígenos de revestimento para sorodiagnóstico de sífilis. Neste estudo, um protótipo de plataforma de diagnóstico de teste treponêmico baseado em peptídeos para o diagnóstico da sífilis foi validado por um estudo transversal de precisão do diagnóstico. O peptídeo CETp0435 demonstrou um desempenho de diagnóstico excepcional, atingindo 100% de sensibilidade e especificidade, AUC=1,0. Os peptídeos CETp0171 e CETp0574 também apresentaram uma elevada precisão de diagnóstico. Embora o CETp0684 e o CETp0453 tenham apresentado um desempenho moderado, o CETp0453 apresentou uma especificidade limitada. O ELISA com base em peptídeos oferece a vantagem da detecção semi-quantitativa de anticorpos contra a sífilis utilizando amostras humanas, o que pode ser valioso para o rastreamento dos títulos de anticorpos contra antígenos imunodominantes treponêmicos, bem como para avaliar a eficácia da abordagem terapêutica da sífilis.

Como perspectiva, sugere-se a avaliação destes peptídeos noutros biobancos de sífilis para aumentar a robustez em todas as fases da sífilis, bem como avaliar outras IST e doenças infecciosas que potencialmente tem reação cruzada com sífilis. Além disso, estes peptídeos podem ser adaptados a diagnósticos de imunoensaio rápido, seguindo os critérios REASSURED da OMS para testes no local de prestação de cuidados. A identificação de infecções latentes tardias, como as fases iniciais, e a epidemiologia podem desempenhar um papel importante no teste treponêmico para o diagnóstico da sífilis.

REFERÊNCIAS

- Agüero-Seña Ac, Pillay A, Radolf Jd. Treponema e Brachyspira. Espiroquetas Associadas a Hospedeiros Humanos, p 1083-1108. Em Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, McAdam AJ, Patel R, Richter SS, Warnock DW (ed). Manual de microbiologia clínica, 12ª ed. ASM Press, Washington, DC. 2019.
- Amrun, S.N., et al. Linear B-cell epitopes in the spike and nucleocapsid proteins as markers of SARS-CoV-2 exposure and disease severity. *EBioMedicine* 58, 1–9. 2020. Doi.org/10.1016/j.ebiom.
- Arnouts, S. et al. Technology Readiness Levels for vaccine and drug development in animal health: From discovery to life cycle management. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, 21 dez. 2022.
- Arroll T.W et al. T-Cell Responses to Treponema pallidum subsp. pallidum Antigens during the Course of Experimental Syphilis Infection, *Infection and Immunity* p. v. 67, n.9, 4757–4763. 1999.
- Avelleira Jr, Bottino G. Sífilis: Diagnóstico, tratamento e controle. *Anais Bras Dermatol*; 81(2):111-26, 2006. Doi: 10.1590/S0365-05962006000200002.
- Backhouse, J. L and NESTEROFF, S. I. Treponema pallidum western blot: comparison with the FTA-ABS test. 2001.
- Baughn, R. E., et al. Epitope Mapping of B-Cell Determinants on the 15-Kilodalton Lipoprotein of Treponema pallidum (Tpp15) with Synthetic Peptides. *Infection and Immunity*, 64(7), 2457-2466. 1996.
- Biasini M, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* Jul;42(Web Server issue): W252-8. 2014. Doi: 10.1093/nar/gku340.
- Blanco, D. R., Miller, J. N., Lovett, M. A. Surface antigens of the syphilis spirochete and their potential as virulence determinants. *Emerging Infectious Diseases* 3(1):11-20. 1997.
- Braga, Antônio; Cortes, João Pedro; Pritsivelis, Caroline; Junior, Lybio Martire. Why is knowing the history of syphilis is critical, even during the COVID-19 pandemic? *DST j. bras. doenças sex. transm*; 33: 1-5, 2021.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Sífilis. Brasília 2017. Disponível em: file:///C:/Users/user/Downloads/boletim_sifilis_11_2017.pdf. Acesso em 04 de março de 2025.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para atenção integral às pessoas com infecções sexualmente transmissíveis [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2020. Disponível em: file:///C:/Users/user/Downloads/pcdt_ist_final_revisado_020420.pdf Acesso em: 04 de março de 2025.

Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis, Boletim Epidemiológico de Sífilis, Número Especial, Ano V – nº 01, outubro de 2021, ISSN: 2358-9450.

Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (PCDT-IST). Brasília, DF: Ministério da Saúde. 2022. Disponível em: [file:///C:/Users/user/Downloads/pcdt-ist-2022_isbn%20\(5\).pdf](file:///C:/Users/user/Downloads/pcdt-ist-2022_isbn%20(5).pdf) Acesso em : 04 de Março de 2025.

Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico de 2024. Brasília: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: [file:///C:/Users/user/Downloads/boletim_Sifilis_2024_e%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/user/Downloads/boletim_Sifilis_2024_e%20(3).pdf) Acesso em: 04 de março de 2025.

Brinkman, M. B. et al. Reactivity of Antibodies from Syphilis Patients to a Protein Array Representing the *Treponema pallidum* Proteome †. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 3, p. 888–891, 2006a.

Brinkman, M. B. et al. Reactivity of Antibodies from Syphilis Patients to a Protein Array Representing the *Treponema pallidum* Proteome. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 3, p. 888–891, mar. 2006b.

Bueno, L. L. et al. Identification of a Highly Antigenic Linear B Cell Epitope within *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1). *PLoS ONE*, v. 6, n. 6, 2011.

Bossuyt Pm, et al. STARD Group. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ*. 2015 Oct 28;351:h5527. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26511519/> Acesso em 04 de março de 2025. Doi: 10.1136/bmj.h5527.

Braga, Aline de Oliveira. Aspectos gerais da infecção pela bactéria *Treponema pallidum*: uma revisão. 2018. 63 f. Monografia (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Natal, 2018. Orientadora: Dra. Janeusa Trindade de Souto.

Brautigam, C. A., et al. The Tp0684 (MglB-2) Lipoprotein of *Treponema pallidum*: A Glucose-Binding Protein with Divergent Topology. *PLoS ONE*, 11(8), e0161022. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161022>.

Campo, J. J., et al. A Novel Pan-Proteome Array for High-Throughput Profiling of the Humoral Response to *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*: a Pre-Clinical Study. *bioRxiv*. 2024. <https://doi.org/10.1101/2024.04.20.590429>. Acesso em: 04 de março de 2025.

Cao W., et al. Vantagens e limitações das abordagens laboratoriais de diagnóstico atuais em sífilis e sífilis congênita. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 21 (12), 1339–1354. 2023. <https://doi.org/10.1080/14787210.2023.280214>

Casal, C. A. D.; Araújo, E. D. C.; Corvelo, T. C. D. O. Aspectos imunopatogênicos da sífilis materno-fetal: revisão de literatura. *Revista Paranaense de Medicina*, Belém, v. 26, n. 2, p. 2–7, abr./jun. 2012.

Centers for Disease Control and Prevention (Cdc). Resultados discordantes da triagem de sífilis de sequência reversa --- Five Laboratories, Estados Unidos, 2006--2010. Relatório Semanal de Morbidade e Mortalidade (MMWR). 11 de fevereiro de 2011; 60(05): 133-137. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/>. Acesso em: 04 de março de 2025.

Centurion-Lara, A., C. et al. Lukehart. The flanking region sequences of the 15-kDa lipoprotein gene differentiate pathogenic treponemes. *J. Infect. Dis.* 177:1036–1040. 1998.

Chassé, M.; Fergusson, D. A. Diagnostic Accuracy Studies. *Seminars in Nuclear Medicine*, v. 49, n. 2, p. 87–93, mar. 2019.

Chen. Jinlin, et al *Treponema pallidum* outer membrane proteins: current status and prospects, *Pathogens and Disease*, Volume 80, Issue 1, 2022.

Cheng W, et al. The role of *Treponema pallidum* 47-kDa membrane lipoprotein in promoting peripheral blood monocyte-derived dendritic cell maturation without enhancing CC chemokine receptor type 7-mediated dendritic cell migration [published online ahead of print 4 November 2022]. *Adv Clin Exp Med.* 2023.

Chia Cc, Chao Cm, Lai Cc. Diagnoses of syphilis and HIV infection during the COVID-19 pandemic in Taiwan. *Sex Transm Infect*;97(04):319. 2021. Doi: 10.1136/sextrans-2020-054802.

Cohen Se, et al. Sífilis na era moderna: uma atualização para médicos. *Infect Dis Clin North Am.*; 27:705–722. 2013. Doi: 10.1016/j.idc.2013.08.005.

Cox, D. L. et al. The outer membrane, not a coat of host proteins, limits antigenicity of virulent *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*, v. 60, n. 3, p. 1076–1083, mar. 1992a.

Cox, D. L. et al. The outer membrane, not a coat of host proteins, limits antigenicity of virulent *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*, v. 60, n. 3, p. 1076–1083, mar. 1992b.

Cusini M, et al. Trend of main STIs during COVID-19 pandemic in Milan, Italy. *Sex Transm Infect.*;97(02):99. 2021. Doi: 10.1136/sextrans-2020-054608.

De Oliveira, M. E. et al. Accuracy improvement enzyme-linked immunosorbent assay using superparamagnetic/polyethylene glycol) nanoparticles for leishmaniasis diagnostic. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 109, n. 3, p. 116326, jul. 2024.

Deka, R. K., et al., The PnrA (Tp0319; TmpC) lipoprotein represents a new family of bacterial purine nucleoside receptor encoded within an ATP-binding cassette (ABC)-like operon in *Treponema pallidum*. *The Journal of Microbiology Chemistry.* 281(12):8072-81. 2006.

Dy, Yi. Et al. *Treponema pallidum* protein Tp47 induced prostaglandin E2 to inhibit the phagocytosis in human macrophages. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2024 Jun;38(6):1166-1178. Epub 2024 Jan 23. PMID: 38258964. Doi: 10.1111/jdv.19809.

Edmondson Dg, Hu B, Norris Sj. Long-Term In Vitro Culture of the Syphilis Spirochete *Treponema pallidum subsp. pallidum*. mBio. 9(3): e01153-18. 2018 Jun 26. Doi: 10.1128/mBio.01153-18. PMID: 29946052; PMCID: PMC6020297.

Egesten, A. et al. Binding of Albumin Promotes Bacterial Survival at the Epithelial Surface. Journal of Biological Chemistry, v. 286, n. 4, p. 2469–2476, jan. 2011.

Emini, E.A., et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. J. Virol. 55, 836–839. 1985. <https://doi.org/10.1128/jvi.55.3.836-839.1985>.

European Center for Disease Prevention and Control. Syphilis. In: ECDC. Annual Epidemiological Report for 2022. Stockholm: ECDC; 2024.

Fan Y.M et al. Immunophenotypes apoptosis and expression of Fas and Bcl-2 from peripheral blood lymphocytes in patients with secondary early syphilis, Sex Transm Dis., v. 31 n. 4, p.221-4. 2004.

Fang J., et al Examinando associações na infecção por sífilis congênita e fatores socioeconômicos entre condados metropolitanos de pequeno a médio e grande porte da Califórnia. J. Perinatol. 42:1434–1439. 2022.

Ferreira A, et al. Strategies for partner notification for sexually transmitted infections, including HIV. Cochrane Database Syst Rev. 2013(10):CD002843. 2013 Oct 3. Doi: 10.1002/14651858.CD002843.pub2.

Flipse, J., Niekamp, A., Dirks, A., Dukers-Muijers, N., Hoebe, C., Wolffs, P., & Van Loo, I. Refinando o diagnóstico oportuno da sífilis precoce usando PCR de *Treponema pallidum* ou imunoblotting de IgM ao lado da sorologia convencional para sífilis. Journal of Clinical Microbiology, 61. 2023. <https://doi.org/10.1128/jcm.00112-23>.

Folgosi, VA. Desenvolvimento de peptídeos sintéticos para o diagnóstico sorológico da infecção ocasionada pelos vírus linfotrópicos de células T humanas tipo 1 e 2 (HTLV-1 e 2). 2023. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5133/tde-27062023-121527/>. Acesso em: 31 jan. 2025.

Forrestel Ak, Kovarik Cl, Katz Ka. Sífilis sexualmente adquirida: diagnóstico laboratorial, manejo e prevenção. J Am Acad Dermatol 82 :17–28. 2020. Doi: 10.1016/j.jaad.2019.02.074.

Fraser, C. M. et al. Complete Genome Sequence of *Treponema pallidum*, the Syphilis Spirochete. SCIENCE, v. 281, p. 375–388, 17 jul. 1998.

Freitas, F. L. S., et al. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: sífilis adquirida. Epidemiologia E Serviços De Saúde, 30(spe1), e2020616. 2020. <https://doi.org/10.1590/S1679-4974202100004.esp1>

Furlam To, Pereira Cc, Frio Gs, Machado Cj. Efeito colateral da pandemia de Covid-19 no Brasil sobre o número de procedimentos diagnósticos e de tratamento da sífilis. Rev Bras Estud Popul;39: e0184. 2022. Doi: 10.20947/S0102-3098a0184.

Galvani, N. C. et al. Sensitive and specific serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis using a new chimeric protein based on specific B-cell epitopes of *Leishmania* antigenic proteins. *Microbial Pathogenesis*, v. 162, n. November 2021, 2022.

Garcia, L. N.; Smith, T. J.; Johnson, P. R. Multilocus sequence typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in children with syphilis acquired by nonsexual contact. *Journal of Medical Microbiology*, v. 71, n. 4, p. 123-130, 2022.

Gaspar pc, et al Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: testes diagnósticos para sífilis. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* [online]. 2021, v. 30, n. spe1 e2020630. 2021. Doi: 10.1590/S1679-4974202100006.esp1. Acessado 13 janeiro 2025.

Giacani, L., et al Immunological evaluation and cellular location analysis of the TprI antigen of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *Infection and Immunity*.73(6):3817-22. 2005.

Giacani L, et al. Quantitative analysis of tpr gene expression in *Treponema pallidum* isolates: Differences among isolates and correlation with T-cell responsiveness in experimental syphilis. *Infect Immun*.75(1):104-12. Jan. 2007. Doi: 10.1128/IAI.01124-06. Epub 2006 Oct 9.

Giacani, L., et al. Antigenic variation in *Treponema pallidum*: TprK sequence diversity accumulates in response to immune pressure during experimental syphilis. *Journal of Immunology*. v.184, n.7, p. 3822 – 3829, 2010.

Golden Mr, Marra Cm, Holmes Kk. Atualização sobre sífilis: ressurgimento de um problema antigo. *JAMA*. 290:1510–1514. 2003. Doi: 10.1001/jama.290.11.1510.

Guex, N.; Peitsch, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, v. 18, n. 15, p. 2714–2723, 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9504803/>>. Acesso em: 04 de março de 2025.

Hardy, P. H.; Levin, J. Lack of Endotoxin in *Borrelia hispanica* and *Treponema pallidum*. *Experimental Biology and medicine*, v. 174, n. 1, p. 47–52, 1 out. 1983.

Haynes, A. M et al. Evaluation of a minimal array of *Treponema pallidum* antigens as biomarkers for syphilis diagnosis, infection staging, and response to treatment. *Bacteriology Research Article* 2024. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03466-23>

Hazlett, K. R O., et al. TP0453, a Concealed Outer Membrane Protein of *Treponema pallidum*, Enhances Membrane Permeability. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6499–6508. 2005. <https://doi.org/10.1128/JB.187.18.6499-6508>.

Hilgert, LM. Soroprevalência de sífilis em um hemocentro do norte do Rio Grande do Sul. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Passo Fundo, 2019.

Horvath, Attila. Biology and natural history of syphilis. In: GROSS, G.; TYRING, S. K. (ed.). Sexually transmitted infections and sexually transmitted diseases. [s. l.]: Springer, p. 129-141. 2011.

Houston, S., Gomez, A., Geppert, A. et al. Deep proteome coverage advances knowledge of *Treponema pallidum* protein expression profiles during infection. *Sci Rep* 13, 18259 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45219-8>.

Ijsselmuiden Oe, et al. Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay using the recombinant DNA-derived *Treponema pallidum* protein TmpA for serodiagnosis of syphilis and the potential use of TmpA for assessing the effect of antibiotic therapy. *J Clin Microbiol.* 27(1):152-7. 1989 jan. Doi: 10.1128/jcm.27.1.152-157.1989. PMID: 2643617; PMCID: PMC267251.

Jaiswal, A.K., Tiwari, S., Jamal, S.B. et al. *Treponema pallidum* pan-genome reveals differences in genome plasticity between venereal and non-venereal syphilis-related subspecies. *BMC Genomics* 21, 33. 2020.

Jepsen, O. B.; Hougen, K. H.; Birch-Andersen, A. Electron microscopy of *Treponema pallidum* Nichols. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 241-258, 1968.

Jerrold H. ZAR. *Biostatistical Analysis* (5th Edition). 5. ed. [s.l.] Pearson, 2009.

Jie, X. Expression of specific antigens TP17 and TP0453 of *Treponema pallidum* and development of an indirect ELISA method using the expressed products as diagnostic antigens. *Chinese Journal of Biologicals*. 2010.

Ke, C. Ao, et al. Evaluating the clinical utility of semi-quantitative luciferase immunosorbent assay using *Treponema pallidum* antigens in syphilis diagnosis and treatment monitoring. *Emerg Microbes Infect* 13. 2024. <https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2348525>.

Kelesidis T. The Cross-Talk between Spirochetal Lipoproteins and Immunity. *Frontiers in Immunology*. v.5, p. 310, 2014.

Komori A, Mori H, Xie W, Valenti S, Naito T. Rapid resurgence of syphilis in Japan after the COVID-19 pandemic: A descriptive study. *PLOS ONE* 19(3): e0298288. 2024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0298288>.

Kronvall, G. et al. Specific absorption of human serum albumin, immunoglobulin A, and immunoglobulin G with selected strains of group A and G streptococci. *Infection and Immunity*, v. 25, n. 1, p. 1–10, jul. 1979.

Kubanov A, Runina A, Deryabin D. Novel *Treponema pallidum* Recombinant Antigens for Syphilis Diagnostics: Current Status and Future Prospects. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:1436080. Epub 2017 Apr 24. Doi: 10.1155/2017/1436080. PMID: 28523273; PMCID: PMC5421087.

Lafond, R. E., et al. TprK sequence diversity accumulates during infection of rabbits with *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* Nichols strain. *Infection and Immunity*. 74(3):1896-906. 2006.

Lafond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan;19(1):29-49. doi: 10.1128/CMR.19.1.29-49.2006. PMID: 16418521; PMCID: PMC1360276.

Lage, D. P. Avaliação de uma proteína hipotética específica de *Leishmania* no sorodiagnóstico e desenvolvimento de uma vacina contra as leishmanioses. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

Lanna, Ana Carolina Paes Martins. Teste e padronização de alvos recombinantes de proteínas para o diagnóstico da doença de Chagas. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015. Orientador: Alexandre Ferreira Marques. Coorientadora: Daniella Castanheira Bartholomeu.

Laver, W.G., Air, G.M., Webster, R.G., Smith-Gill, S.J. Epitopes on Protein Antigens: Misconceptions and Realities Minireview. *Cell* 61, 553–556. 1990.

Li, W., Zhou, X., Cai, J. et al. A proteína recombinante de *Treponema pallidum* Tp0768 promove a secreção de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos por meio do estresse do RE e da via ROS/NF- κ B. *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 353–366. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11018-8>

Lieberman NAP, et al. *Treponema pallidum* genome sequencing from six continents reveals variability in vaccine candidate genes and dominance of Nichols clade strains in Madagascar. *PLoS Negl Trop Dis* 15(12): e0010063. 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010063>

Lien E et al. Toll-like receptor 2 functions as patterns recognition receptor for diverse bacterial products. *J. Biol. Chem.* v. 247, n. 47, p. 33419-33425, 1999.

Lin Mj, Haynes Am. et al. Longitudinal TprK profiling of in vivo and in vitro propagated *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* reveals accumulation of antigenic variants in the absence of immune pressure. *PLoS Negl Trop Dis.* 7;15(9): e0009753. 2021 Sep DOI: 10.1371/journal.pntd.0009753. PMID: 34492041; PMCID: PMC8480903.

Liu LL, et al. Analysis of serum metabolite profiles in syphilis patients by untargeted metabolomics. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 33(7):1378-1385. 2019 Jul. Doi: 10.1111/jdv.15530.

Liu D, Tong ML, Lin Y, Liu LL, Lin LR, Yang TC. Insights into the genetic variation profile of tprK in *Treponema pallidum* during the development of natural human syphilis infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 22;13(7): e0007621. 2019 Jul. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007621. PMID: 31329597; PMCID: PMC6675121.

Liu D, Liu L, Zheng X, Chen R, Lin L, Yang T, Tong M, Genetic Profile of Full-Length tprK Gene in Patients with Primary and Secondary Syphilis. *Spectrum Microbiol* 11: e04931-22. 2023. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04931-22>.

Luo Y, Xie Y, Xiao Y. Laboratory Diagnostic Tools for Syphilis: Current Status and Future Prospects. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 10:574806. Published 2021 Feb 8. doi:10.3389/fcimb.2020.574806.

Mcgill MA, et al. Characterization and Serologic Analysis of the *Treponema pallidum* Proteome. *Infection And Immunity.* 78 (6):2631–2643. 2010. Doi: 10.1128/iai.00173-10.

Machado-de-Ávila, R.A., et al. Prediction of the epitopes by selecting amino acid residues with specific physical-chemical and structural attributes available in Blue Star Sting database. *Immunome Res.* 10, 1–6. 2014. <https://doi.org/10.4172/17457580.1000083>.

Maia, CMF, et al. Impact In Notified Syphilis Diagnosis During The Covid-19 Pandemic In Brazil, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, Volume 136, Issue 1, 2023.

Manning, B. D., & Toker, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. , 169(3), 381-405. 2017. Doi: 10.1016/j.cell.2017.04.001. Acesso em: 04 de março de 2025.

Mathes, T.; Pieper, D. An algorithm for the classification of study designs to assess diagnostic, prognostic and predictive test accuracy in systematic reviews. *Systematic Reviews*, v. 8, n. 1, p. 226, 3 dez. 2019.

Matthias J, et al. Frequência e características de resultados de testes biológicos falso-positivos para sífilis relatados na Flórida e na cidade de Nova York, EUA, de 2013 a 2017. *J Clin Microbiol* 2019;57:e00898-19.

Meneses, I. I. F. de S., et al. Avaliação de proteínas recombinantes para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis* por ELISA. *Embrapa Gado de Corte. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 34. 2015. Disponível em: <http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/bp/BP34.pdf>. Acesso em: 14 de janeiro de 2025.

Merrifield, R. B. Solid-phase peptide synthesis. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, v. 32, p. 221–296, 1969.

Morshed MG, SINGH AE. Recent trends in the serologic diagnosis of syphilis. *Clin Vaccine Immunol.* Feb;22(2):137-47. 2015. Doi: 10.1128/CVI.00681-14. Epub 2014 Nov 26.

Mubemba B, et al. Geographically structured genomic diversity of non-human primate-infecting *Treponema pallidum* subsp. *pertenue*. *Microb Genom.* 2020 Nov;6(11):mgen000463. doi: 10.1099/mgen.0.000463. PMID: 33125317; PMCID: PMC7725339.

Nadal, Sidney Roberto; Framil, Valéria Maria de Souza. Interpretação das Reações Sorológicas para Diagnóstico e Seguimento Pós-Terapêutico da Sífilis. *Revista Brasileira de Coloproctologia*, 2007; 27(4): 479-482.

Oliveira, D. K. F., et al. Synthetic peptides are useful immunodiagnostic tools for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in pigs. *Laboratory of Immunoparasitology “Dr. Mário Endsfeldz Camargo”*, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. 2024.

Oliveira, Paola Cristina Brandão Ferreira de. Sífilis: diagnóstico e identificação molecular de amostras clínicas de pacientes com apresentação atípica. 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas) – Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Niterói, 2016.

Organização Mundial da Saúde (OMS). WHO guidelines for the treatment of *Treponema pallidum* (syphilis). Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2016. ISBN 978 92 4 154980 6.

Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização Pan-Americana da Saúde, Representação no Brasil. Políticas públicas de controle das IST, do HIV/Aids, das Hepatites Virais, da Tuberculose, Micobacterioses não Tuberculosas, Micoses Sistêmicas (TB) e da Hanseníase fortalecidas de acordo com os princípios e diretrizes do SUS. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. 2021.

Paiva, Vinícius Fernandes de. Utilização de peptídeos sintéticos derivados de moléculas imunodominantes de *Toxoplasma gondii* para diagnóstico sorológico da toxoplasmose em ovinos e galinhas caipiras. 2016. 89 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

Papp Jr, Park IU, Fakile Y, Pereira L, Pillay A, Bolan GA. Recomendações de laboratório do CDC para testes de sífilis, Estados Unidos. *MMWR Recomm Rep* 2024;73(No. RR-1):1–32. 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.rr7301a1>

Park IU, et al. Screening for syphilis with the treponemal immunoassay: analysis of discordant serology results and implications for clinical management. *J Infect Dis*. Nov;204(9):1297-304. 2011. Doi: 10.1093/infdis/jir524

Passos, Mrl, et al. Sífilis, história, ciência e artes: calendário da história da sífilis. *Revista Brasileira de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, 33. 2021. <https://www.bjstd.org/revista/article/view/1136>.

Peeling, Rosanna W., Hook, Edward, W. The pathogenesis of syphilis: the Great Mimicker, revisited. *The Journal of Pathology. Special Issue: Infection and Disease: Cause and Cure*. v.208, n.2, p. 224 – 232, 2006.

Peeling RW, Syphilis. *Primers*. 2017 Oct 12; 3:17073. doi: 10.1038/nrdp.2017.73. PMID: 29022569; PMCID: PMC5809176.

Pereira, R.; Oliveira, J.; Sousa, M. Bioinformatics and computational tools for next generation sequencing analysis in clinical genetics. *Journal of clinical medicine*, v. 9, n. 1, p. 132, 2020.

Pham Md, Ong Jj, Anderson Da, et al. Point-of-care diagnostics for diagnosis of active syphilis infection: needs, challenges and the way forward. *Int J Environ Res Public Health* 2022;19. doi:10.3390/ijerph19138172. [Epub ahead of print: 04 07 2022].

Pinchera, B.; et al. Características epidemiológicas e clínicas da sífilis no século XXI: um estudo retrospectivo observacional de sete anos em pacientes ambulatoriais. 2022.

Pinheiro, Y. T.; Silva, R. A. R. Da. Has the COVID-19 Pandemic Affected the Epidemiology of Syphilis in Brazil? *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 2022.

Posey, J. E., Hardham, J. M., Norris, S. J., Gherardini, F. C. Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(19):10887-9. 1999.

Procop GW, et al. Atlas colorido de Koneman e livro-texto de microbiologia diagnóstica, 7 ed. Lippincott Williams & Wilkins, Filadélfia, PA.

Puccio Ja, et al. Resurgence Of Syphilis. ADV PEDIATR. 2019 Aug; 66:231-244. 2019. Doi: 10.1016/j.yapd.2019.03.006. Epub 2019 Apr 30. PMID: 31230696.

Purwoko, M., et al. Exame Laboratorial da Sífilis. Bioscientia Medicina: Revista de Biomedicina e Pesquisa Translacional. 2021. <https://doi.org/10.32539/BSM.V5I3.339>.

QUEIROZ, J. H. F. DE S. Estudo de proteínas antigênicas do *Treponema pallidum*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS. Disponível em <https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>. 2019.

Radolf, J. D. et al. Identification and localization of integral membrane proteins of virulent *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* by phase partitioning with the nonionic detergent triton X-114. *Infection and immunity*, v. 56, n. 2, p. 490–8, fev. 1988.

Radolf, J. D.; Norgard, M. V; Schulz, W. W. Outer membrane ultrastructure explains the limited antigenicity of virulent *Treponema pallidum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 86, n. 6, p. 2051–5, mar. 1989.

Radolf, J. D. et al. Characterization of outer membranes isolated from *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Infection and Immunity*, v. 63, n. 11, p. 4244–4252, nov. 1995.

Radolf Jd. *Treponema pallidum* and the quest for outer membrane proteins. *Mol Microbiol*. 1995; 16:1067–1073.

Radolf, J. D. Et Al. *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: making a living as a stealth pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 12, p. 744–759, 10 dez. 2016.

Radolf, J. D.; Kumar, S. The *Treponema pallidum* Outer Membrane. *Curr Top Microbiol Immunol.*, p. 1–38, 2018.

Reid, T. B., et al. *Treponema pallidum* periplasmic and membrane proteins are recognized by circulating and skin CD4+ T cells. *bioRxiv*. (2024). <https://doi.org/10.1101/2024.02.27.581790>

Reis, M. A. et al. *Treponema pallidum*: percepção de vulnerabilidade à infecção pelas mulheres trabalhadoras da segurança pública de Goiás. *Saúde e Pesquisa*, 16(4), e11835. 2023. <https://doi.org/10.17765/2176-9206.2023v16n4.e11835>.

Robson, B. Computers and viral diseases. Preliminary bioinformatics studies on the design of a synthetic vaccine and a preventative peptidomimetic antagonist against the SARS-CoV-2 (2019-nCoV, COVID-19) coronavirus. *Computers in Biology and Medicine*, v. 119, n. February, p. 103670, 2020.

Rodrigues, M. R. et al. Immunodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis using recombinant *Leishmania infantum* Prohibitin protein and a synthetic peptide containing its conformational B-cell epitope. *Journal of Immunological Methods*, v. 474, n. April, p. 112641, 2019.

Rozendo, A. S., et al. Estratégias de indução na produção de antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi*. Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, PB. 2014.

Runina, A. V., et al. ImmunoChip for Syphilis Serodiagnostics with the Use of Extended Array of *Treponema pallidum* Recombinant Antigens. *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*, 165(6), 726-731. Original article submitted November 2, (2018). Translated from Russian. Springer Science+Business Media, LLC.

Salazar, J. C.; Hazlett, K. R. O.; Radolf, J. D. The immune response to infection with *Treponema pallidum*, the stealth pathogen. *Microbes and Infection*, v. 4, n. 11, p. 1133–1140, set. 2002.

Salazar, J. C.; et al. *Treponema pallidum* Elicits Innate and Adaptive Cellular Immune Responses in Skin and Blood during Secondary Syphilis: A Flow-Cytometric Analysis. *J Infect Dis.* v.195, n.6, p. 879-887, 2007.

Salazar, Juan C., & Radolf, Justin. D. T cell responses to *Treponema pallidum* proteins in blood and skin to advance syphilis vaccine design: learning from nature. *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 230, Edição 2, 15 de agosto de 2024, Páginas 275–277.

Salomão, R.. *Infectologia: Bases clínicas e tratamento* 1. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. ISBN: 978-85-277-3261-1.

Sankaran D, Partridge E, Lakshminrusimha S. Congenital Syphilis-An Illustrative Review. *Children (Basel)*. 2023 Jul 29;10(8):1310. doi: 10.3390/children10081310. PMID: 37628309; PMCID: PMC10453258.

Santacroce L. et al. Ioannis, The “Scourge of the Renaissance”. A brief review on *Treponema pallidum* infection, endocrine, metabolic and immunological disorders - drug targets 2020; 20(3). <https://dx.doi.org/10.2174/1871530319666191009144217>.

Sato, N. S. et al. Analysis of *Treponema pallidum* recombinant antigens for diagnosis of syphilis by western blotting technique. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 41, n. 2, p. 115–118, mar. 1999.

Satyaputra F, et al. The Laboratory Diagnosis of Syphilis. *J Clin Microbiol.* 2021 Sep 20;59(10):e0010021. doi: 10.1128/JCM.00100-21.

Scussel R, et al. Peptide-Integrated Superparamagnetic Nanoparticles for the Identification of Epitopes from SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins. *ACS Appl Nano Mater.* 2022 Jan 28;5(1):642-653. doi: 10.1021/acsanm.1c03399.

Seña Ac, et al. Clinical and genomic diversity of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* to inform vaccine research: an international molecular epidemiology study. *Lancet Microbe.* September 2024; 5(9):100871. DOI: 10.1016/S2666-5247(24)00087-9. Epub 2024 August 22nd. PMID: 39181152; PMCID: PMC11371664.

Sievers, F., et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 1–6. 2011.

Silva, A. A. O., Et al. Performance of *Treponema pallidum* recombinant proteins in the serological diagnosis of syphilis. *PLoS ONE*, 15(6), e0234043. 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234043>

Silva, R. C. C. Da., & Alves, M. C. S. O uso de ferramentas de bioinformática para análise de dados genéticos: uma revisão. *Scientific Electronic Archives*, 17(1). 2023. <https://doi.org/10.36560/17120241872>.

Silva, Â., et al. Performance evaluation of treponemal and nontreponemal tests for the diagnosis of acquired syphilis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 110, 1237 - 1244. 2024. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.23-0238>

Smajs, D., Norris, S. J., Weinstock, G. M. Genetic diversity in *Treponema pallidum*: implications for pathogenesis, evolution and molecular diagnostics of syphilis and yaws. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, v.12, n.2, p.191–202. 2012.

SONMEZ C, SEZEN F, KILIC S. Performance evaluation of nine different syphilis serological tests in comparison with the FTA-abs test. *J Immunol Methods*. Jan; 464:9-14. 2019. Doi: 10.1016/j.jim.2018.08.007. Epub 2018 Aug 20. PMID: 30138611.

Sun, A., Fan, X., Shen, X., Tang, R., & Yan, J. Expressão recombinante do antígeno de fusão com base nos peptídeos de epítipo TpN17 e TpN47 de *Treponema pallidum* e estabelecimento e aplicação do ELISA associado. *Sheng wu gong cheng xue bao = Revista chinesa de biotecnologia*, 25 8, 1187-94. 2009.

Sun Ran, Lai Di-Hui, Ren Rong-Xin, Lian Shi, Zhang Hai-Ping. *Treponema pallidum*-specific antibody expression for the diagnosis of different stages of syphilis. *Chin Med J* 2013;126(2):206-210.

Stavrakoudis, A. Conformational Flexibility in Designing Peptides for Immunology: The Molecular Dynamics Approach. *Current Computer Aided-Drug Design*, v. 6, n. 3, p. 207–222, 2010.

Tampa M, Sarbu I, Matei C, Benea V, Georgescu Sr. Brief history of syphilis. *J Med Life*. 2014 Mar 15;7(1):4-10. Epub 2014 Mar 25. PMID: 24653750; PMCID: PMC3956094.

Tang, Y., Zhou, Y., He, B. et al. Investigation of the immune escape mechanism of *Treponema pallidum*. *Infection* 51, 305–321 (2023). <https://doi.org/10.1007/s15010-022-01939-z>

Tosca A et al. Infiltrate of syphilitic lesions before and after treatment, *Genitourin Med*, v. 64, p. 289-293, 1988.

Tuddenham S., Katz S., Ghanem K. Diretrizes Laboratoriais de Sífilis: Características de Desempenho de Testes de Anticorpos Não Treponêmicos. *Clin. Infectar. Des.* 71, S21-S42. 10.1093/cid/ciaa306. 2020.

Tudor Me, Al About Am, Leslie Sw, et al. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534780>.

UNITED NATIONS. Transforming our World: the 2030 Agenda for Sustainable Development. United Nations Sustainable Development Summit New York, USA, set. 2015.

Vazquez-Alvarado M. et al. Evaluation of chromogenic substrates for horseradish peroxidase on paper-based microfluidic devices. *Sens Actuators B Chem* 2023; 377:133028. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.133028>.

Walker, E. M. et al. Demonstration of rare protein in the outer membrane of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* by freeze-fracture analysis. *Journal of bacteriology*, v. 171, n. 9, p. 5005–11, set. 1989.

Walter, G. Production and use of antibodies against synthetic peptides. *Journal of Immunological Methods*, v. 88, p. 149–161, 1986.

Wang, Si-Ning; Zhang, Rui-Li. Research progress on ultrastructure of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *International Journal of Dermatology and Venereology* ():10.1097/JD9.000000000000386, May 09, 2024. | DOI: 10.1097/JD9.000000000000386.

Waterhouse, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2018.

Weinstock, G.M. et al. The genome of *Treponema pallidum*: new light on the agent of syphilis, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 22, Issue 4, October 1998, Pages 323–332, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00373.x>.

World Health Organization (WHO). Diagnóstico laboratorial de doenças sexualmente transmissíveis, incluindo o vírus da imunodeficiência humana. Geneva: WHO, 2013. p. 175-188. cap. 15. Disponível em: <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241505840/pt/>.

World Health Organization (WHO). Implementing the global health sector strategies on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2022–2030: Report on progress and gaps 2024. Geneva: World Health Organization; 2024.

Xie, J., et al. Performance of nontreponemal tests and treponemal tests in cerebrospinal fluid for the diagnosis of neurosyphilis: a meta-analysis. *Frontiers in Public Health*, 11. 2023. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1105847>.

Xinyan Shi, et al. Omics detection and treatment of syphilis, *Clinica Chimica Acta*, Volume 565, 120008, ISSN 0009-8981, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.120008>.

Xu M, Xie Y, et al. A novel ELISA using a recombinant outer membrane protein, rTp0663, as the antigen for serological diagnosis of syphilis. *Int J Infect Dis*. 2016 Feb; 43:51-57. doi: 10.1016/j.ijid.2015.12.013.

Yang J, et al. MicroRNA-101-3p, MicroRNA-195-5p, and MicroRNA-223-3p in Peripheral Blood Mononuclear Cells May Serve as Novel Biomarkers for Syphilis Diagnosis. *Microb Pathog*. 2021 Mar; 152:104769. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104769. Epub 2021 Jan 30. PMID: 33524569.

Zarakolu, P. Avanços recentes no diagnóstico laboratorial da sífilis]. Mikrobiyoloji bulteni , 57 1, 141-155. 2023. <https://doi.org/10.5578/mb.20239912>.

Zhang Rui-Fen, Zhuang Hui, Jiang Zhi-Bin, Comparação de diferentes imunoenaios enzimáticos baseados em antígenos recombinantes para detecção de anticorpos contra *Treponema Pallidum*[J]. Revista Chinesa de Saúde Pública, 2002, 18(6): 673-674.DOI: 10.11847/zgggws2002-18-06-17.

Zhang Y, Goh Sm, Mello Mb, et al. Improved rapid diagnostic tests to detect syphilis and yaws: a systematic review and meta-analysis. Sex Transm Infect 2022; 98:608–616. doi:10.1136/sextrans-2022-055546.

Zhang. Yun. et al. Development of an automated processing platform based on luciferase fused TPP17 to detect specific *Treponema pallidum* antibody in clinical serum with high sensitivity and rapidity, International Journal of Biological Macromolecules, Volume 283, Part 1, 2024, 137530, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137530>.

Zheng. Xin-Qi. et al. *Treponema pallidum* recombinant protein Tp47 enhanced interleukin-6 secretion in human dermal fibroblasts through the toll-like receptor 2 via the p38, PI3K/Akt, and NF- κ B signalling pathways, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Volume 1870, Issue 7, 2023, 119540, ISSN 0167-4889, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2023.119540>.

APÊNDICE(S)

APÊNDICE A – PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Tabela MS1 - Determinação do peso molecular a partir da massa monoisotópica e do padrão de fragmentação dos peptídeos sintéticos

Peptídeo	Fórmula molecular	Massa isotrópica (g/mol)	Ions de fragmentação (m/z)
CETp0171	C ₁₃₁ H ₁₉₉ N ₄₁ O ₃₈	2956.27	985.84 (+3)
			739.63 (+4)
			591.90 (+5)
			493.42 (+6)
			423.08 (+7)
			370.32 (+8)
CETp0435	C ₈₀ H ₁₃₄ N ₂₄ O ₂₆	1848.09	1847.99 (1+)
			924.50 (2+)
			616.67 (3+)
			462.75 (4+)
			370.40 (5+)
			308.83 (6+)
			264.86 (7+)
CETp0574	C ₁₂₃ H ₁₉₆ N ₃₆ O ₄₃	2867.12	1433.72 (+2)
			956.15 (+3)
			717.36 (+4)
			574.09 (+5)
			478.57 (+6)
CETp0684	C ₇₇ H ₁₁₇ N ₂₃ O ₂₈	1812.91	906.92 (+2)
			604.95 (+3)
			453.96 (+4)
			362.37 (+5)
			302.98 (+6)
			259.84 (+7)
CETp0453	C ₁₀₂ H ₁₆₂ N ₃₀ O ₃₅ S ₁	2400.65	2400.16 (1+)
			1200.58 (2+)
			800.72 (3+)
			600.79 (4+)
			480.84 (5+)
			400.87 (6+)
			343.74 (7+)

Fonte: Da autora, 2025.

ANEXO(S)

ANEXO A – APROVAÇÃO DO CEP

UNIVERSIDADE DE RIO VERDE / FUNDAÇÃO
DO ENSINO SUPERIOR DE RIO VERDE -
FESURV

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE SORODIAGNÓSTICO PARA SÍFILIS A PARTIR DA PREDIÇÃO POR BIOINFORMÁTICA DE EPÍTOPOS DAS PROTEÍNAS (TPN37, TPN47, TPN17) DE TREPONEMA PALLIDUM VALIDADOS POR ESTUDO DE

Pesquisador: LARA CÂNDIDA DE SOUSA MACHADO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 59241322.0.0000.5077

Instituição Proponente: FESURV - Universidade de Rio Verde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.473.188

Apresentação do Projeto:

Natureza do estudo: Projeto de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, para exame de qualificação em Ciências da Saúde.

Desenho do estudo: Serão realizadas coletas de amostras de sangue humano periférico em até duzentos indivíduos voluntários, saudáveis ou não (positivos para sífilis). Serão coletados 4 a 5 mL, de cada voluntário, por punção venosa. O material será processado e analisado em laboratório utilizando-se de protocolos técnicos e análises em softwares específicos.

Local: a coleta de sangue será realizada no Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA) de Rio Verde – Goiás.

Critério de Inclusão:

- indivíduos saudáveis, ou não, entre 18 e 80 anos;
- de ambos os sexos, que tenham sido submetidos a testes diagnóstico para sífilis;
- que aceitem participar como voluntários do estudo.

UNIVERSIDADE DE RIO VERDE / FUNDAÇÃO
DO ENSINO SUPERIOR DE RIO VERDE -
FESURV



Continuação do Parecer: 5.473.188

Critério de Exclusão:

- indivíduos que não foram submetidos a teste diagnóstico prévio para sífilis
- que também não desejarem participar da pesquisa.

Amostra: 200 participantes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Desenvolver um diagnóstico sorológico com alta sensibilidade e especificidade, podendo oferecer resultados rápidos para a Sífilis, a partir da predição e síntese de moléculas peptídicas identificadas através de ferramentas de bioinformática, que irão prever epítomos de células B humanas provenientes de proteínas que forem identificadas e selecionadas da bactéria de *Treponema pallidum*, utilizando-os como antígenos de cobertura para sorodiagnóstico tipo ELISA a fim de obter uma alternativa de diagnóstico ainda mais

preciso e eficaz. Objetivo Secundário:

1. Comparar a similaridade da estrutura primária de proteínas da *Treponema pallidum* na Sífilis primária com outras proteínas da bactéria de sífilis secundária e terciária, utilizando o algoritmo Blast-P (protein-protein BLAST), utilizando o programa Clustal Ômega para o alinhamento das sequências escolhidas;
2. Prever epítomos específicos de células B das proteínas alvos, por meio de programa bioinformática como ABCPred e IEDB.
3. Avaliar na estrutura 3D e desenhar por bioinformática peptídeos que mimetizem os epítomos identificados e que estejam presentes somente em proteína da Sífilis primária, secundária e terciária;
4. Sintetizar os peptídeos desenhados pela técnica Fmoc-sínteses;
5. Validar os peptídeos como antígenos para sorodiagnóstico por meio do ensaio ELISA utilizando-se as amostras de soro dos voluntários deste presente termo.
6. Validar a performance dos peptídeos por meio de parâmetros de acurácia.

UNIVERSIDADE DE RIO VERDE / FUNDAÇÃO
DO ENSINO SUPERIOR DE RIO VERDE -
FESURV



Continuação do Parecer: 5.473.188

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

- moderados uma vez que o procedimento de coleta de sangue por punção venosa pode acarretar a formação de hematoma, que é originado pelo extravasamento do sangue para o tecido, durante o procedimento ou após. A dor local se caracteriza por ser o sintoma de maior desconforto ao paciente. Sendo esta dor, durante e após a punção, considerada de baixa intensidade e suportável (ANDRIOLO et al., 2010).

Pode-se evitar esses riscos pressionando o local puncionado por três minutos após a retirada da agulha. Solicitar que evitar dobar o braço por alguns minutos. Não massagear o local da punção venosa. Durante a primeira hora não fazer esforço físico, carregar bolsa ou outros tipos de peso com o braço puncionado. Observar se roupa, relógio ou pulseira estão apertando o braço. Caso ainda ocorra algum hematoma, orientamos que seja colocada compressa de gelo por 15 a 20, 3 vezes ao dia, nas primeiras 24 horas. Em seguida, se necessário, colocar compressas mornas.

Benefícios:

- desenvolver um teste sorológico mais rápido e mais eficiente que os atuais, melhorando a especificidade ao identificar indivíduos infectados com sífilis e de indivíduos com outros tipos de infecções;
- vigilância da propagação da sífilis;
- importante ferramenta para o efetivo enfrentamento da descoberta de novos casos, podendo assim tratar o paciente tão logo que se descubra a doença, evitando a evolução para formas mais graves como a neurosífilis.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Preceitos éticos: assegurados pela pesquisadora no tocante ao sigilo e confidencialidade dos dados, anonimato dos participantes bem como na garantia de indenização ao participante;

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Protocolo de Pesquisa apresentado contém os seguintes documentos:

- Folha de rosto devidamente assinada;

**UNIVERSIDADE DE RIO VERDE / FUNDAÇÃO
DO ENSINO SUPERIOR DE RIO VERDE -
FESURV**



Continuação do Parecer: 5.473.188

- TCLE em forma de convite constando: objetivos, riscos e benefícios, metodologia e os contatos dos pesquisadores e do CEP. Apresenta vocabulário adequado ao nível de compreensão do participante de pesquisa;
- Carta de Anuência da Instituição Co-Participante;
- Projeto Completo;
- Cronograma de Execução factível;

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UniRV não observou óbices éticos e considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UniRV considera o presente protocolo APROVADO. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UniRV o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa.

Solicitamos também que o CEP seja informado de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal da pesquisa por ele aprovados e, especificamente, os efeitos adversos (Resolução CNS 466/12).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1958024.pdf	02/06/2022 14:40:20		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	02/06/2022 14:39:42	LARA CÂNDIDA DE SOUSA MACHADO	Aceito
	TCLE.pdf	02/06/2022 14:39:42	LARA CÂNDIDA DE SOUSA MACHADO	Aceito

Projeto Detalhado / Brochura	BROCHURA.docx	02/06/2022 14:38:44	LARA CANDIDA DE SOUSA MACHADO	Aceito
Investigador				
Orçamento	ORCAMENTO.docx	02/06/2022 14:38:26	LARA CÂNDIDA DE SOUSA MACHADO	Aceito
Declaração de concordância	ANUENCIA.pdf	02/06/2022 14:37:20	LARA CÂNDIDA DE SOUSA MACHADO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	02/06/2022 14:37:08	LARA CÂNDIDA DE SOUSA MACHADO	Aceito
Folha de Rosto	FR.pdf	02/06/2022 14:36:26	LARA CÂNDIDA DE SOUSA MACHADO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO VERDE, 15 de Junho de 2022

Assinado por:
RENATO CANEVARI DUTRA DA SILVA
(Coordenador(a))

Endereço: R.Rui Barbosa, N° 03.
Centro

CEP: 75.901-

UF: GO **Município:** RIO

Telefone (64)3622-

Fax: (64)3620-

E-mail: