UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Desenvolvimento de um método sorológico para o diagnóstico
laboratorial da esquistossomose mansoni baseado em peptídeos
sintéticos.

Edward José de Oliveira

São Paulo
2005

Desenvolvimento de um método sorológico para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni baseado em peptídeos sintéticos.

Edward José de Oliveira

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas para obtenção do grau de
DOUTOR em Farmácia

Área de Concentração: Análises Clínicas
Orientadora: Prof^a Dr^a Hermínia Yohko Kanamura
Co-orientador: Prof. Tit. Mário Hiroyuki Hirata

São Paulo

2005

Folha de Aprovação

Edward José de Oliveira

Desenvolvimento de um método sorológico para o diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoni baseado em peptídeos sintéticos.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor
Área de Concentração: Análises Clínicas

Aprovado em 20 de Dezembro de 2005.

Banca Examinadora

Profª Drª Hermínia Yohko Kanamura
(Orientadora/Presidente)
FCF/USP

Profª Drª Doralice de Souza
1ª Examinadora
Sec. do Estado de Saúde do
Estado de São Paulo

Prof. Tit. Mário Hiroyuki Hirata
2º Examinador
FCF/USP

Prof. Dr. Luiz Carlos Pedrosa Valli
3º Examinador
Faculdade Brasileira

Dr. Pedro Luis da Silva Pinto
4º Examinador
Inst. Adolfo Lutz

*À minha esposa Fabíola, aos nossos
filhos Pedro e Vinícius, companheiros
inseparáveis de todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Hermínia Yohko Kanamura, a quem sou muitíssimo grato pela amizade, orientação e pelos conhecimentos transmitidos durante o mestrado e o doutorado, contribuindo para meu crescimento científico e cultural.

Ao Prof. Titular Mário Hiroyuki Hirata, pela amizade, pela co-orientação e por ter viabilizado a síntese dos peptídeos junto ao Center for Biologics Evaluation and Research (HFM1), Food and Drug Administration (FDA).

Ao Dr. Pedro Luis da Silva Pinto, pesquisador do Setor de Enteroparasitoses do Instituto Adolfo Lutz, pelas sugestões e modificações propostas neste trabalho no momento do exame de qualificação e da defesa.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Pedrosa Valli, do Curso de Farmácia, Faculdade Brasileira, pela leitura minuciosa, pelas correções e sugestões realizadas neste trabalho.

À Profª Drª Doralice de Souza, da Divisão de Doenças de Transmissão Hidrica e Alimentar, Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria do Estado da Saúde do Estado de São Paulo, pela revisão e colaboração neste trabalho.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FBC/FCF/USP), pela oportunidade de aperfeiçoamento, em nome da Chefe Profª. Tit. Ana Campa.

À Profª Drª Kioko Takei, professora da disciplina de Imunologia Clínica do FBC/FCF/USP, pela amizade e colaboração na padronização do método imunoenzimático de ELISA-Peptídeo.

À Profª Assoc. Adelaide José Vaz, pela amizade, pela oportunidade de conviver e aprender juntamente com os outros alunos do Laboratório de Imunologia Clínica do FBC/FCF/USP.

À Profª Drª Irene da Silva Soares do FBC/FCF/USP, pela leitura e revisão criteriosa deste trabalho no exame de qualificação.

À Drª Nga Yen Nguyen pesquisadora do Center for Biologics Evaluation and Reserch, FDA, pela colaboração neste trabalho de pesquisa.

À Profª Drª Ana Julia Urias dos Santos Araujo, do Laboratório de Parasitologia, Instituto Básico de Biociências da Universidade de Taubaté (UNITAU), pela amizade e por ter cedido parte dos vermes de *Schistosoma mansoni* usada para produção de antígenos.

À Drª Isabel Rodrigues de Carvalho, pesquisadora do Laboratório de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas-PA, por ter cedido parte das amostras de soro usada neste trabalho de pesquisa.

Ao Dr. Arnaldo Stelini Junior, patologista e proprietário do Laboratório Diagnóstico Médico Stelini, pela amizade e por ter cedido parte das amostras de soro empregada no presente trabalho de pesquisa.

A Cibele Gargioni, pesquisadora do Setor de Enteroparasitoses do Instituto Adolfo Lutz, pela parceria científica e pelas lâminas usadas na reação de imunofluorescência indireta (RIFI-IgM) e parte dos vermes empregada para produção de antígenos.

À Dr^a Amélia Maria de Jesus, do Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia, por parte das amostras de soro usada neste estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de doutorado durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos: Alberto, Andréia, Cristina, Cristiane, Eloi, Fabiana, Heloisa, Noeli do Laboratório de Imunologia Clínica do FBC/FCF/USP, pela convivência e amizade compartilhada durante o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do FBC/FCF/USP: Álvaro, Ana, André, Cristina, Evelyn, Fabiana, Fernando, Jamile, Lídio, Maria Alice, Mustafá, Paulo, Raquel, Silvia, Simone, Verônica, , pelo companherismo demonstrado.

Aos amigos do FBC/FCF/USP: Silene, Sueli, Ana, Dora, Edna, Fábio, Renata, Dorlei, Dona Carmem, pelo carinho.

Aos amigos: Jorge, Elaine, Maria José (Majô), da Secretaria de Pós-Graduação da FCF/USP, pela atenção e simpatia a min dispensados durante o doutorado.

A todos os colegas e professores do FBC/FCF/USP, que me incentivaram durante o curso de doutorado.

RESUMO

OLIVEIRA, E.J. **Desenvolvimento de um método sorológico para diagnóstico laboratorial da esquistossomose mansoní baseado em peptídeos sintéticos.** 2005. 114 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Baseado nos algoritmos de hidrofiliidade e flexibilidade obtidos pelo uso do “software” ProtScale, acessível no endereço <http://au.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>, foram selecionados sete peptídeos, potencialmente antigênicos, das proteínas de *Schistosoma mansoní*, entre elas, catepsina B (Sm 31), “heat shock protein” de 70 kDa (HSPSm-70), “cathodic circulating antigen” (CCA), e uma seqüência da fase de leitura aberta do clone ET03. Estes peptídeos, produzidos por síntese química, foram denominados P1, P2, P3, P4, P5, P6 e P7. Em seguida, os peptídeos foram testados isoladamente contra “pool” de soros humanos positivos e negativos. Após vários testes, os peptídeos P1, P2, P3, P6 e P7, que apresentaram imunorreatividade quando ensaiados por método imunoenzimático, foram usados na padronização de um método imunoenzimático de ELISA, utilizando placas Costar 3590, que passou a ser denominado ELISA-Peptídeo (ELISA-Pp). Este método foi avaliado empregando-se 192 amostras de soro, divididas em quatro grupos: (A) 23 amostras de soro, coletadas de pacientes residentes no Nordeste do Brasil, portadores de esquistossomose aguda, com ovos de *S. mansoní* nas fezes; (B) 30 amostras de soro, coletadas de pacientes residentes no Norte do Brasil, portadores de esquistossomose crônica, com ovos de *S. mansoní* nas fezes; (C) 39 amostras de soro, coletadas de indivíduos residentes no Norte do Brasil, portadores de outras parasitoses, mas não esquistossomose; (D) 100 amostras de soro, coletadas de indivíduos residentes em Campinas-SP, negativos pelo exame coproparasitológico. Os resultados obtidos foram analisados comparativamente com os encontrados por outras metodologias imunodiagnósticas: reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos IgM contra tubo digestivo de verme (RIF-IgM), método imunoenzimático para detecção de anticorpos IgM contra antígenos polissacarídeos (ELISA-IgM) ou anticorpos IgG contra extrato total de vermes (ELISA-IgG). A sensibilidade do ELISA-Pp foi de 86,6%, quando avaliado frente a soros de pacientes que apresentaram ovos de *S. mansoní* nas fezes e de 79,3%, considerando como esquistossomótico aqueles pacientes com sorologia positiva pelos métodos de RIF-IgM e ELISA-IgM. A especificidade do ELISA-Pp foi de 94,2% e 94,7%, respectivamente, considerando como grupo controle, não esquistossomótico, indivíduos com resultado de exame parasitológico de fezes negativo para ovos de *S. mansoní* ou indivíduos com sorologia negativa pelo ELISA-IgM e RIF-IgM. O valor preditivo positivo apresentado pelo ELISA-Pp foi de 85,2% enquanto para os outros métodos sorológicos variou de 63,4% a 78,6%. O valor preditivo negativo do ELISA-Pp foi em média 3% inferior aos obtidos pelos outros métodos sorológicos. Comparando-se os resultados obtidos pelo ELISA-Pp com os dos outros métodos sorológicos, melhor concordância foi demonstrada com os resultados do ELISA-IgM (Índice Kappa=0,75). Os índices de reatividade para detecção de anticorpos IgG e IgM foram significativamente maiores ($P < 0,05$) nos pacientes com esquistossomose aguda (grupo A) do que crônica (grupo B). No presente estudo, ELISA-Pp demonstrou bom desempenho (eficácia diagnóstica = 81,0%), entretanto novos estudos são necessários para avaliação de sua aplicabilidade em inquéritos soroepidemiológicos.

Palavras-chave: imunodiagnóstico; peptídeo sintético; teste imunoenzimático de ELISA

ABSTRACT

OLIVEIRA, E.J. **Development of a serologic method for laboratory diagnosis of the schistosomiasis mansoni based on synthetic peptides.** 2005. 114 f. Thesis (doctoral) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Based on algorithms of hydrophilicity and flexibility, obtained by the use of the ProtScale software, disposable at the site <http://au.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>, seven potentially antigenic peptides were selected from different *Schistosoma mansoni* proteins: cathepsin B (Sm31), heat shock protein (SmHSP-70), cathodic circulating antigen (CCA) and the polypeptidic sequence of the open reading frame (ORF) of the ET-03 clone. The peptides were produced by chemical synthesis and denominated as P1, P2, P3, P4, P5, P6 and P7. These were independently tested against two pools of human sera, one positive and one negative for schistosomiasis. The peptides P1, P2, P3, P6 and P7, that presented better reactivity when assayed by an immunoenzymatic method, were chosen to be used as antigen for the standardization of an ELISA method, by utilizing Costar 3590 micro plates, and it was called Peptide-ELISA (Pp-ELISA). This method was evaluated on 192 serum samples, divided in four groups: (A) 23 samples from patients with acute schistosomiasis and positive for *S. mansoni* eggs in fecal examination, who were living in a Brazilian Northeast state; (B) 30 samples from patients with chronic schistosomiasis and positive for *S. mansoni* eggs, who were living in a Brazilian North state; (C) 39 samples from individuals with other parasite infection, but no schistosomiasis, living in a Brazilian North state; (D) 100 samples from clinically healthy individuals who presented negative results for coproparasitologic method, living in Campinas, São Paulo State. The serological data obtained by Pp-ELISA were comparatively analyzed with the results obtained by other immunodiagnostic methods: immunofluorescence test for detection of IgM antibodies against gut associated antigens (IgM-IFT); ELISA for detection of IgM antibodies against gut associated polysaccharide antigens (IgM-ELISA) or for detection of IgG antibodies against worm crude antigens (IgG-ELISA). The sensitivity of Pp-ELISA was of 86,6%, considering as schistosomiasis patients only the ones who presented *S. mansoni* eggs in stool examination, and 79,3%, when a serological criterion was used for definition of schistosomiasis patients, with positive results for both IgM-IFT and IgM-ELISA. The specificity of the Pp-ELISA was respectively 94,2% or 94,7%, considering as control group, without schistosomiasis, *S. mansoni* egg negative individuals in stool examination or serologically negative individuals by both tests, IgM-IFT and IgM-ELISA. The positive predictive value for Pp-ELISA was 85,2%, while for the other serologic methods varied from 63,4% to 78,6%. The negative predictive value for Pp-ELISA was as a rule 3% lower than the indices obtained for other serologic methods. When the results of Pp-ELISA were compared with the ones obtained by other serologic methods, better concordance was demonstrated with IgM-ELISA (Kappa indice = 0,75). The reactivity indices for detection of IgG and IgM antibodies were significantly higher ($P < 0,05$) in acute (group A) than chronic schistosomiasis patients (group B). In this study the Pp-ELISA presented a good performance (Diagnostic efficacy = 81,0%), however further studies must be necessary for evaluation of its applicability on seroepidemiologic surveys.

Keywords: imunodiagnosis; Synthetic peptide; immunoenzymatic assay of ELISA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES		Páginas
Figura 1	Esquema geral das etapas do desenvolvimento do ELISA-Pp	36
Figura 2	Algoritmos de hidrofiliidade da catepsina B	39
Figura 3	Algoritmos de flexibilidade da catepsina B	39
Figura 4	Algoritmos de hidrofiliidade da HSPSm70	40
Figura 5	Algoritmos de flexibilidade da HSPSm70	40
Figura 6	Algoritmos de hidrofiliidade do CCA	41
Figura 7	Algoritmos de flexibilidade do CCA	41
Figura 8	Algoritmos de hidrofiliidade da fase de leitura aberta do clone ET03	42
Figura 9	Algoritmos de flexibilidade da fase de leitura aberta do clone ET03	42
Figuras 10,11 e 12	Seleção dos peptídeos com potencial imunodiagnóstico pela técnica de “Dot-blot”	56-57
Figura 13	Seleção dos peptídeos com potencial imunodiagnóstico pelo método imunoenzimático de ELISA usando a estratégia 1	58
Figura 14	Seleção dos peptídeos com potencial imunodiagnóstico pelo Método imunoenzimático de ELISA usando a estratégia 2	59
Figura 15	“Pool” de peptídeos como antígeno para o imunodiagnóstico da esquistossomose mansoni	61
Figura 16	Índices de reatividade para detecção de anticorpos IgG pelo método de ELISA-Pp	67
Figura 17	Positividade para detecção de anticorpos IgM pelo ELISA-Pp	68

LISTA DE TABELAS		Paginas
Tabela 1	Seqüência de aminoácidos dos peptídeos potencialmente antigênicos	43
Tabela 2	Análise comparativa do potencial imunodiagnóstico dos peptídeos, usando duas diferentes estratégias de sensibilização no método imunoenzimático de ELISA	60
Tabela 3	Taxas de positividade obtidas pelos métodos sorológicos de acordo com o grupo estudado	62
Tabela 4	Parâmetros de sensibilidade e especificidade obtidos pelos métodos sorológicos em relação ao método coparassitológico	63
Tabela 5	Parâmetros obtidos pelos métodos sorológicos tendo como referência o exame coparassitológico	64
Tabela 6	Parâmetros de sensibilidade e especificidade do método de ELISA-Pp em relação à sorologia “convencional”	65
Tabela 7	Análise comparativa dos resultados obtidos pelo ELISA-Pp em relação aos dos outros métodos sorológicos	66

LISTA de ABREVIATURAS

CAA	Circulating Anodic Antigen (antígeno circulante anódico)
CCA	Circulating Cathodic Antigen (antígeno circulante catódico)
cDNA	Complementary Desoxiribunucleic acid (ácido desoxirribonucleico complementar)
DNA	Desoxiribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)
EDTA	Ethylenodiaminetetraacetic acid (ácido etilenodiaminotetraacético)
ELISA	“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (enzimaimunoensaio)
GASP	Gut Associated Proteoglycan (antígeno associado ao tubo digestivo)
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrogênio
HSPSm-70	Heat Shock Protein (Proteína de choque térmico de <i>S. mansoni</i> de 70 kDa)
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IPTG	Isopropil-Beta-D-Tiogalactopiranosídeo
IR	Índice de Reatividade
kDa	Kilodaltons (Quilodaltons)
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
OPD	Ortophenilenodiamine (ortofenilenodiamina)
ORF	Open Reading Frame (fase de leitura aberta)
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
PMSF	Phenylmethil Sulphonyl Fluoride (fluoreto de fenil-metil-sulfonil)
PVDF	Polyvinylidene fluoride (Polifluoreto de Vinilideno)
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico)
RP-HPLC	Reverse-Phase High Pressure Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta pressão em fase reversa)
Sm 31/32	Fração Protéica de <i>S. mansoni</i> de 31/32 kDa
SPFS	Síntese de Peptídeo em Fase Sólida
SSTF	Solução Salina Tamponada com Fosfatos
TCA	Trichloroacetic Acid (ácido tricloro acético)
TFA	Trifluoroacetic Acid (ácido trifluoroacético)
T _H 1	Linfócito T helper tipo 1
T _H 2	Linfócito T helper tipo 2
TNF	Tumor Necrosis Factor (fator de necrose tumoral)
Tween	Monolairato de polioxietileno sorbitol
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1 - Introdução -----	14-32
1.1 – Aspectos gerais-----	15-21
1.2 – Diagnóstico laboratorial -----	21-28
1.3 – Síntese química de peptídeos -----	28-31
1.4 – Justificativa-----	31-32
2 – Objetivos -----	33-34
3 – Material e métodos -----	35-54
3.1 – Esquema geral das etapas seguidas para o desenvolvimento do ELISA-Peptídeo -----	36
3.2 – Pesquisa das seqüências de aminoácidos das proteínas antigênicas de <i>S. mansoni</i> -----	37
3.3 – Seleção de peptídeos potencialmente antigênicos-----	37-43
3.4 - Síntese química dos peptídeos selecionados -----	44
3.5 – Mistura “Pool” de amostras de soro positivas e negativas-----	44
3.6 – Seleção dos peptídeos com potencial imunodiagnóstico pela técnica de “Dot-blot” -----	45
3.7 – Seleção dos peptídeos com potencial imunodiagnóstico pelo método imunoenzimático de ELISA-----	46-47
3.8 – Preparação dos substratos antigênicos-----	47-48
3.8.1 - Antígeno solúvel de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> -----	47
3.7.2 - Fração solúvel em ácido tricloro acético -----	47-48
3.8.3 - Lâminas com cortes de vermes adultos parafinados -----	48
3.9 – Testes sorológicos para detecção de anticorpos-----	48-51
3.9.1- Métodos imunoenzimático de ELISA	48-50
3.9.1.1 - Método imunoenzimático de ELISA-Peptídeo (ELISA-Pp) -----	48-49
3.9.1.2 - Método imunoenzimático de ELISA-IgM -----	49-50
3.9.1.3 - Método imunoenzimático de ELISA-IgG -----	50
3.9.1.4 – Determinação do índice de reatividade (IR) -----	50
3.9.2 – Reação de imunofluorescência indireta (RIFI-IgM) -----	50-51

3.10 – Avaliação do ELISA-Pp -----	51-54
3.10.1 – Teste de reprodutibilidade interensaio -----	51
3.10.2 – Caracterização das amostras séricas estudadas -----	51-53
3.10.3 – Análise estatística -----	53-54
4 – Resultados -----	55-68
4.1 – Seleção dos peptídeos com potencial imunodiagnóstico pela técnica de “Dot-blot” -----	56-57
4.2 – Seleção dos peptídeos com potencial imunodiagnóstico pelo método imunoenzimático de ELISA -----	58-59
4.3 – Comparação do potencial imunodiagnóstico dos peptídeos sintéticos usando as estratégias de sensibilização 1 e 2 no método imunoenzimático de ELISA -----	60
4.4 – “Pool” de peptídeos como antígeno para imunodiagnóstico da esquistossomose -----	61
4.5 – Taxas de positividade obtidas pelos métodos sorológicos -----	62
4.6 – Sensibilidade e especificidade dos métodos sorológicos em relação ao exame coproparasitológico -----	63
4.7 – Parâmetros de valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e eficácia diagnóstica obtidos pelos métodos sorológicos em relação ao exame coproparasitológico -----	64
4.8 – Sensibilidade (co-positividade) e especificidade (co-negatividade) do método de ELISA-Pp em relação à sorologia “convencional” -----	65
4.9 – Análise comparativa entre os resultados obtidos pelo ELISA-Pp e pelos outros métodos sorológicos -----	66
4.10 – Análise dos índices de reatividade para detecção de anticorpos IgG pelo método de ELISA-Pp. -----	67
4.10 – Positividade para detecção de anticorpos IgM pelo método de ELISA-Pp -----	68
5 – Discussão -----	69-79
6 – Conclusões -----	80-81
Referências -----	82-93
Apêndices -----	94-103