

Péptidos sintéticos para el diagnóstico y vigilancia epidemiológica en esquistosomosis mansonii

Oscar Noya^{1,2}, Carmen Guzmán³, Diana Ballén¹, Henry Bermúdez¹, Noraida Zerpa², Alfredo Noda², Cecilia Colmenares¹, Sandra Losada¹, Belkisyolé Alarcón de Noya¹

El diagnóstico de laboratorio de la esquistosomosis es uno de los problemas por resolver, especialmente en áreas de bajas cargas parasitarias, como Venezuela, además de ser también una de las limitantes la evaluación de las nuevas vacunas contra esta parasitosis. Por esta razón, nos planteamos desarrollar métodos de inmunodiagnóstico basados en la detección de anticuerpos y de antígenos circulantes utilizando la estrategia de la síntesis química, para elaborar péptidos derivados de la catpesina B (Sm31) y la asparaginil endopeptidasa (Sm32). Tres de los péptidos de la Sm31 fueron reconocidos al menos por el 49% de los pacientes y de ellos el IMT-180, lo fue por el 86%, exhibiendo además una alta especificidad (100%). Dos de los péptidos de la Sm31 y 3 de la Sm32 indujeron en conejos, el reconocimiento de las respectivas moléculas, inclusive en cortes histológicos. Resultados preliminares de inmunoensayos de captura anti-Sm32 han revelado una baja sensibilidad.

INTRODUCCIÓN

La esquistosomosis es la segunda enfermedad parasitaria en importancia a escala mundial después de la malaria. En Venezuela, se observa la reemergencia progresiva de esta parasitosis, aunque predominan los individuos (80%) con bajas cargas parasitarias (< 100 huevos/gr heces) (Alarcón de Noya *et al*, 1999). Por este hecho, en especial, los métodos de diagnóstico tanto parasitológico (Kato-Katz) y en menor grado aún, como inmunológicos (Pruebas de Precipitación Circumoval – PPCO, inmunofluorescencia

indirecta –IFI y ELISA), han logrado alcanzar niveles de sensibilidad y especificidad aceptables. Además, ninguna de ellas reúne todas las condiciones de bajo costo, simplicidad, alta especificidad y sensibilidad así como correlación con la actividad y carga parasitaria (Alarcón de Noya *et al*, 1996). Previamente, Deelder y colaboradores desarrollaron un inmunoensayo enzimático de detección de los antígenos catódicos y anódicos circulantes (Deelder *et al*, 1989), el cual ha sido de utilidad solo en áreas de moderadas y altas cargas parasitarias (El-Morshed *et al*, 1996). Por esta razón, nos hemos propuesto desarrollar técnicas de inmunodiagnóstico basados en la captura de antígenos de excreción-secreción, presentes en el regurgito de los vermes adultos, como son la catepsina B (Sm 31) y la asparaginil - endopeptidasa (Sm 32). Debido a que el hábitat de los vermes adultos es el lecho vascular, es predecible la captura de componentes de estos antígenos de excreción - secreción en la circulación periférica. Basándonos en las características

¹Sección de Biohelmintiasis, Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. ²Laboratorio para Estudios sobre Malaria, Dirección General Sectorial de Malariología y Saneamiento Ambiental y el Instituto Nacional de Higiene del MSAS. ³Cátedra de Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela. Fax: 58-2-6930454. Correo electrónico: noyao@yahoo.com.

antigénicas de estas moléculas y (Noya *et al*, 1995) y en el conocimiento de su secuencia (Klinkert *et al*, 1989) se sintetizaron péptidos de ambas moléculas, con el fin de utilizarlos como antígenos en pruebas para detectar anticuerpos y como inmunógenos en conejos, con el fin de producir anticuerpos policlonales mono-específicos que puedan ser usados en técnicas de inmunocaptura por ELISA.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Antígeno crudo de verme adulto (AVA): se obtuvo de la cepa JL de *S. mansoni* (donada por el Dr. Italo Cesari, IVIC) mantenida en ratones. El sobrenadante de vermes homogeneizados, tratados con inhibidores de proteasas (1 mM de PMSF y 1 mM de EDTA) y sometidos a centrifugación a 12.000g x 2 h a 4°C, fue denominada AVA (5).

2.- Sueros y plasmas de humanos fueron obtenidos de muestreos epidemiológicos de las áreas endémicas (Edos. Carabobo, Aragua y Vargas) y caracterizados parasitológica (Kato-Katz) e inmunológicamente (PPCO, IEFA y ELISA), fueron utilizados en este estudio. Se consideraron como casos positivos a aquellas personas con huevos de *S. mansoni* en las heces y/o por presentar la prueba circumoval positiva (Positividad en 9% de los huevos maduros).

3.- Electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA-SDS), electrotransferencia e inmunotinción: se llevaron a cabo en geles al 9% bajo condiciones disociantes y reductoras. Luego de su electrotransferencia a papel de nitrocelulosa, fueron expuestos a suero inmune de conejos para su revelado con anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa. En presencia de un sustrato luminiscente (Luminol®, Amershan) las bandas reconocidas por los anticuerpos emiten luz, las cuales impresionan un negativo fotográfico (Hyperfilm®, Amershan) (Noya *et al*, 1995). Para la identificación de los péptidos inmunodominantes se pre-incubaron los sueros individualmente con cada uno de los péptidos, a fin de determinar la capacidad de estos de inhibir específicamente el reconocimiento de la proteína original (ensayo de inhibición).

4.- Péptidos sintéticos: 78 péptidos (de 20 aminoácidos c/u) derivados de las proteínas Sm31 y Sm32 fueron sintetizados en sus formas monoméricas (n=39) y polimerizables (n=39). Se utilizó la técnica de síntesis manual en fase sólida, según la estrategia T-boc (Merrifield 1968; Houghten *et al*, 1986) llevada a cabo en el Instituto de Medicina Tropical de la UCV. Los péptidos polimerizables tenían los aminoácidos cisteína-glicina y glicina-cisteína en los extremos en los extremos amino y carboxiterminales, respectivamente.

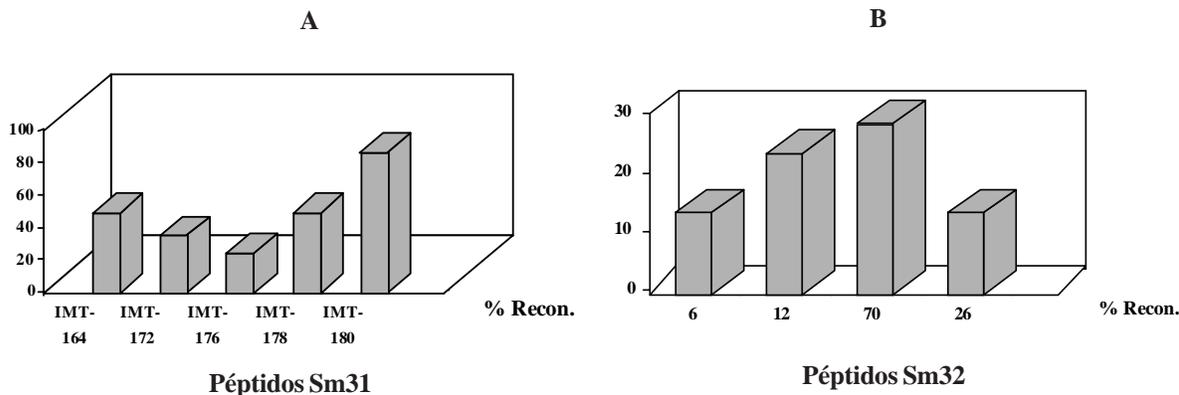
5.- Sueros inmunes anti-péptidos: fueron obtenidos inmunizando grupos de 2 a 3 conejos Nueva Zelanda, con una mezcla de 2 hasta 6 péptidos por vía subcutánea, bajo el esquema de 0, 15 y 30 días. Cada dosis (D) era de 250 µg por péptido, diluido a partes iguales con Adyuvante Completo de Freund (ACF) (1ª D.) e incompleto (AIF) (2ª y 3ª D). Asimismo, se obtuvo el suero pre-inmune y post-inmune 10 días post-3ª D de cada conejo.

6.- Purificación y biotinación de las inmunoglobulinas de conejos: Se utilizaron columnas de Proteína G-Sepharosa para la purificación y biotinación de inmunoglobulinas (IgG) anti péptidos de conejos (EV *et al*, 1978; Pujol *et al*, 1993).

7.- Antigenicidad e inmunogenicidad de los péptidos: se evaluó por las técnicas de inmunoensayo simultáneo de múltiples antígenos (MABA) (Noya & Alarcón de Noya, 1998), utilizando 10 µg/ml de cada antígeno para la sensibilización del papel de nitrocelulosa.

8.- Inmunoensayo enzimático de captura de antígenos: placas Nunc Maxisorb® se activaron con glutaraldehído al 2%, luego se añadieron 100 µL de cada IgG específica purificada por pozo. Plasmas de pacientes o ratones infectados y controles (60 µl) se añadieron y se incubaron por 2 horas a 37°C. Posteriormente a res lavados de 10 min. con PBS Tween 20 (PBS-T) 0,05 %, se añadieron 60 µl del anticuerpo secundario biotinado de conejo y finalmente, luego de tres lavados de 10 min c/u con PBS-T se añadió estreptavina – fosfatasa alcalina para revelar con paranitrofenilfosfato y leer a 410 nm. Como controles

Fig. 1 Reconocimiento de péptidos sintéticos de la Sm 31 y Sm32 de *S. mansoni* por sueros humanos



positivos se utilizaron péptidos híbridos, conteniendo las secuencias reconocibles por el anticuerpo primario de captura y el anticuerpo secundario biotinado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Antigenicidad de péptidos sintéticos:

Tres péptidos derivados de la Sm31 revelaron una notable sensibilidad y especificidad al ser reconocidos por al menos el 49% de los pacientes con esquistosomosis (IMT – 164 = 49%; IMT – 178 = 49%; IMT – 180 = 86%) y por ninguno de los 20 controles negativos (100% especificidad) (Noya *et al*, 1998) (Fig 1A). Al conjugar los resultados de los péptidos IMT – 164 y 180, la sensibilidad asciende al 96%, indicando el gran potencial diagnóstico de estos dos péptidos, en la determinación de anticuerpos específicos en pacientes infectados. La mezcla con péptidos derivados de otras moléculas provenientes de este parásito pudiera elevar la sensibilidad al 100%, preservando una alta especificidad.

Los péptidos derivados de la Sm 32 resultaron ser poco antigénicos (Fig. 1B), siendo el IMT-70 el mas reactivo (29%), sugiriendo que posiblemente los epítopes mas antigénicos son discontinuos y/o conformacionales y los peptidos sintetizados no imitaron adecuadamente esta regiones.

Hasta donde sabemos, nuestro estudio es el primero en utilizar péptidos sintéticos como fuente de antígeno (12) y demostrar además el gran potencial de esta estrategia, debido a la gran sensibilidad y especificidad observadas.

2.-Inmunogenicidad de peptidos sinteticos.-

2.1.- Péptidos derivados de la moléculas

Sm31.- Diez de los diecisiete péptidos sintéticos polimerizables, resultaron ser inmunogénicos en conejos. De ellos, los peptidos IMT-172 y 180 de las regiones 2 y 3 de la proteína, son los inmunodominantes y los responsables de los reconocimiento de las moléculas por Western blot. Los sueros inmunes de estos 2 grupos de conejos reconocieron la molécula nativa en la gastrodermis de vermes adultos, por técnicas inmunohistoquímicas y mostrados en un trabajo publicado recientemente (Noya *et al*, 2001)

2.2.- Péptidos derivados de la molecula

Sm32.- De los 22 péptidos evaluados, 17 resultaron inmunogénicos y solo 3 fueron inmunodominantes , al ser los responsables del reconocimiento de la molécula Sm32 por electrotransferencia e inmunoticion (IMT-12, IMT-14 e IMT-64) (12).

3.- *Inmunoensayo enzimático de captura de antígenos circulantes*. Una vez purificado las IgG anti IMT-172 y 180 de la Sm31 y la IMT12 14 y 64 de la Sm32, se seleccionaron para su biotinación las IgG de los conejos inmunizados con los péptidos IMT 172 (Sm31) e IMT-64 (Sm32) para ser utilizados como segundo anticuerpo de captura, mientras que el resto de las IgGs purificadas se utilizaron como anticuerpo de anclaje a la placa de ELISA.

Resultados preliminares, revelan que la captura de la Sm-32, muestra una mayor señal que con los anticuerpos anti-Sm31, no mejorando la señal de captura cuando se mezclan ambos. Sin embargo, en ensayos preliminares, la sensibilidad con los ensayos de captura es baja y pareciera que se requiere mejorar este ensayo utilizando sondas contra más de un antígeno circulante (Sm31, Sm32 y catepsina D) a fin de lograr la detección de individuos infectados con bajas cargas parasitarias.

Uno de los problemas iniciales en los ensayos de captura, fue la inespecificidad, ya que plasma de personas sin esquistosomosis, resultaron positivas. . Inicialmente pensamos que esta reactividad pudiera deberse a la presencia de anticuerpos anti-Gal, presentes en los plasmas de los pacientes tanto infectados como controles negativos (Galili *et al*, 1993). Sin embargo, esta hipótesis se descartó al no disminuir la reactividad luego de preincubar los plasmas humanos con suero de conejo normal.

Los resultados obtenidos hasta ahora parecieran indicar que existe reactividad cruzada entre las proteínas Sm31 y Sm32 de *S. mansoni*, con proteínas humanas presentes en el plasma de personas no infectadas, las cuales son reconocidas por los sueros de los conejos inmunizados con péptidos sintéticos, particularmente de la Sm32. De hecho la enzima asparaginil endopeptidasa que corresponde a la Sm32, presenta una homología del 56-65 % con la del humano. La existencia de esta enzima era desconocida en el humano para el comienzo de este proyecto de investigación (Chen *et al*, 1997).

COMENTARIOS FINALES

El uso de péptidos sintéticos en ensayos de inmunodiagnóstico basados tanto en la detección de anticuerpos como de antígenos circulantes, muestra un gran potencial como herramienta en los programas de vigilancia epidemiológica. Dos péptidos de la Sm31, han mostrado una alta sensibilidad (96%) y especificidad (100%), de allí que se pudieran utilizar en inmunoensayos enzimáticos de bajo costo, en la delimitación de las áreas de transmisión, mas aún ahora que se incrementa el riesgo de dispersión de esta

parasitosis. El inmunoensayo de captura debe ser mejorado incluyendo otros antígenos circulantes y descartando las regiones de las moléculas homólogas a las del humano, a fin de eliminar la inespecificidad. Sin duda, de lograrse este objetivo, será la prueba de referencia, ya que su positividad esta asociada a la actividad parasitaria, además de reunir las mismas virtudes de sencillez, bajo costo y automatización, para los laboratorios dependientes del programa de control de la esquistosomosis.

REFERENCIAS

- Alarcón de Noya, B., Balzán, C., Arteaga, C., Cesari, I & Noya, O. (1999). The last fifteen years of schistosomiasis in Venezuela: features and evolution. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **94**: 139-146.
- Alarcón de Noya, B., Colmenares, C., Losada, S., Fermin, Z., Masroua, G., Soto, L. & Noya, O. (1996). Do intestinal parasites interfere with the seroepidemiology and surveillance of *Schistosoma mansoni* infection? Epidemiol. Infect. **116**: 323-329.
- Chen, J., Dando, P., Rawlings, N., Brown, M., Young, N., Stevens, R., Hewitt, E., Watts, C. & Barret, A. (1997). Cloning, isolation and characterization of mam malian legumain, and asparaginil endopeptidase. J. Biol Chem. **272**: 8090-8096.
- Deelder A., De Jonge N, Boerman O., Fillie Y. Hilberath G., Rotmans P., Gerrise M. and Lex W. (1989). Sensitive determination of circulating anodic antigen in *Schistosoma mansoni* infected individuals by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. Am. J. Trop. Med Hyg. **40**: 268-272.
- El-Morshed, Y. H., Kinosien, B., Rashida, B., Omer, E., Khamis, N., Deelder, A. M & Philips, M. (1996). Circulating anodic antigen for detection of *Schistosoma mansoni* infection in Egyptian patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. **54**: 149-153.
- Ev, P., Prowse, S. and Jenkin, C. (1978). Isolation of pure IgG₁, IgG₂ and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum, using protein A-Sepharose. Biochem. **15**: 429-436
- Galili, V., Anaraki, F., Thall, A., Hill-Black, C. & Radic, M. (1993). One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the natural anti-Gal antibody. Blood. **82**: 2485-2493.
- Houghten, R., De Graw., M. K., Bray, S.R., Hoffman, B. & Frizzel, S. (1986). Simultaneous multiple peptides synthesis: the rapid preparation of large numbers of discrete peptides for biological, immunological and methodological studies. Bio Techniques. **4**: 522-528.

- Klinkert, M. Felleisen, R., Link, G., Ruppel, A & Beck, E (1989). Primary structures of Sm31/32 diagnostic proteins of *Schistosoma mansoni* and their identification as proteases. *Mol. Biochem. Parasitol.* **33**: 113-122.
- Merrifield, B. (1963). Solid phase peptide synthesis: the synthesis of a tetrapeptide. *J. A. Chem. Soc.* **85**: 2149-2154.
- Noya O., Fermin Z., Alarcón de Noya B., Losada S., Colmenares C. & Hermoso T. (1995). Humoral immuneresponse of children with chronic schistosomiasis. Isotype recognition of adult worm antigens. *Parasite Immunol.* **17**: 319-328.
- Noya, O. & Alarcón de Noya, B. (1998). The multiple antigen blot assay (MABA): a simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens. *J. Immunol Lett.* **63**: 53-56.
- Noya, O., Alarcón de Noya, B., Ballén, D., Zerpa, N. Colmenares, C. Losada, S. & Bermúdez, H. (1998). Use of synthetic peptides derived from adult worm proteins of *Schistosoma mansoni*, in the diagnosis of schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **93**: (Suppl 1): 157-158.
- Noya O., Alarcón de Noya, B., Ballen, D., Bermudez, H., Bout, D., & Hoebeke, J. (2001). Immunogenicity of synthetic peptides from the Sm 31 antigen (cathepsin B) of the *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasite Immunol* **23**: 567-73.
- Pujol, F., Rodríguez, I., Devesa, M., Rangel-Aldao, R. & Liprandi, F. (1993). A double sandwich monoclonal enzyme immunoassay for detection of Hepatitis B surface antigen. *J. Immunoassay.* **14**: 21-31.
-