

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA

Thais Vieira Soares

**APLICAÇÃO DA APIRASE DE BATATA E DE POLIPEPTÍDEO
RECOMBINANTE DERIVADO NO ESTUDO DA ATPDase 2 de
Schistosoma mansoni E DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI**

Juiz de Fora

2012

THAIS VIEIRA SOARES

Aplicação da apirase de batata e de polipeptídeo recombinante derivado no estudo da ATPDase 2 de *Schistosoma mansoni* e da esquistossomose mansoni

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eveline Gomes Vasconcelos

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Priscila de Faria Pinto

Juiz de Fora

2012

Soares, Thais Vieira.

“Aplicação da apirase de batata e de polipeptídeo recombinante derivado no estudo da ATPDase 2 de *Schistosoma mansoni* e da esquistossomose mansoni”. 95 f. 2012.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. ATP difosfohidrolase. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Apirase.

Aplicação da apirase de batata e de polipeptídeo recombinante derivado no estudo da ATPDase 2 de *Schistosoma mansoni* e da esquistossomose mansoni

THAIS VIEIRA SOARES

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Eveline Gomes Vasconcelos - UFJF
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Priscila Faria Pinto - UFJF
(Co-orientadora)

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Alves de Mattos - CPqRR
(Membro Externo)

Prof^a. Dr^a. Florence Mara Rosa - UFJF
(Membro Interno)

Prof^o. Dr. José Otávio do Amaral Correia - UFJF
(Suplente interno)

Prof^a. Dr^a Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz
(Suplente Externo)

Dedico esta tese a minha família, amigos, colegas de trabalho e orientadoras pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas.

Agradeço primeiramente a Deus, por me amparar e mostrar o caminho nas horas mais difíceis e permitir mais esta conquista em minha vida.

A meus pais Selmo e Nailê, pela formação que me permitiram ter, mesmo com todo sacrifício e sempre me apoiando nessa caminhada.

A minha irmã e amiga Maisa, sempre presente e me apoiando em todos os momentos.

A Eveline, por ter me acolhido e depositado a confiança para me orientar, antes mesmo de me conhecer. Por toda paciência, ensinamentos, dicas e tempo dedicados.

A Priscila, por todo carinho, dedicação, paciência, amizade desde a minha formação como farmacêutica, sempre presente em todos os momentos, pronta para ajudar e responder todas as dúvidas. Incentivadora desde o início dessa jornada, mais que uma co-orientadora, foi uma pessoa fundamental para esta realização.

Todas as(os) companheiras(os) do Laboratório de Estrutura e Função de Proteínas: Michélia, Michelle, Carol, Gabriane, Léo, Priscila, Nayara, Dani, Thiago, Jéssica, Laura, Ana Cecília, Lucas, Solon, Wagner, por estarem sempre presentes nestes 24 meses, compartilhando experimentos, ensinamentos, risadas, conversas, congressos e amizade.

Aos colegas da turma do mestrado, com quem aprendi muito durante este tempo, sempre presentes nos estudos e trabalhos necessários para a conclusão desta jornada de todos nós.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade gostaria de expressar toda a minha gratidão e apreço. Muito Obrigada!

RESUMO

Um polipeptídeo originado do domínio B conservado da apirase de batata (r78-117), homólogo ao domínio B da isoforma ATPDase 2 de *Schistosoma mansoni* (r156-195), foi obtido como um polipeptídeo com cauda de hexahistidina (r-potDomínio B). Anticorpos policlonais anti-r-potDomínio B, quando imobilizados em Proteína A-Sepharose, imunoprecipitaram 67-91% das atividades ATPásica e ADPásica de preparação de vermes adultos. Por “Western blots”, o soro imune reconheceu bandas de 63 e 55 kDa na preparação do parasito e no complexo imunoprecipitado, confirmando a identidade da isoforma ATPDase 2. Adicionalmente, anticorpos policlonais anti-r-potDomínio B inibiram 38-58% das atividades ATPásica e ADPásica, sugerindo que o domínio B da ATPDase 2 de *S.mansoni* é um novo alvo para o desenho de inibidores. Amostras de soros de pacientes com esquistossomose foram testados em ELISA usando r-potDomínio B como antígeno. A soropositividade da subclasse IgG1 (27%, 8/30), IgG2 (27%, 8/30), IgG3 (50%, 15/30) ou IgG4 (17%, 5/30) sugeriu que o domínio B da ATPDase 2 está potencialmente envolvido na resposta imune do hospedeiro. A apirase de batata ou r-potDomínio B, emulsificado em adjuvantes Completo e Incompleto de Freund, foi inoculado em camundongos Suíços, aumentando a produção de anticorpos IgG, os quais foram também reativos com antígenos solúveis de ovos (SEA). Imunidade protetora induzida por cada biomolécula foi avaliada 60 dias após o desafio com cercárias. Nenhuma redução de vermes ou do número de ovos foi observada. Camundongos imunizados com apirase de batata desenvolveram altos níveis de anticorpos IgG1 reativos com as biomoléculas e SEA, enquanto anticorpos IgG2a foram produzidos em menor proporção, sugerindo uma tendência de resposta imune do tipo Th2. O r-potDomínio B foi capaz de induzir maior produção de anticorpos IgG2a reativos com as biomoléculas e SEA, uma resposta imune possivelmente associada ao tipo Th1. Análises histológicas de cortes de fígado corados por hematoxilina-eosina, obtidos de camundongos imunizados com apirase de batata, mas não com r-potDomínio B, mostraram uma redução significativa na área do granuloma, como evidenciado pela redução do número de células e substituição por fibras de colágeno. Estudos futuros destas biomoléculas poderão contribuir para um melhor entendimento da interação parasito e hospedeiro, e poderão ser exploradas como novas ferramentas de estudo da esquistossomose.

Palavras chave: *Schistosoma mansoni*, ATP difosfohidrolase, apirase de batata.

SUMMARY

A polypeptide belonging to the conserved domain B (r78-117) from the potato apyrase, homologue to the domain B (r156-195) from the *S. mansoni* ATPDase 2 isoform, was obtained as a 6xHis tag polypeptide (r-potDomain B). Polyclonal anti-r-potDomain B antibodies, when immobilized on Protein A-Sepharose, immunoprecipitated 67-91% of the ATPase and ADPase activities from the adult worm preparation. By Western blots, the immune serum recognized band of 63 and 55 kDa in both parasite preparation and immunoprecipitated complex, confirming the ATPDase 2 identity. Additionally, polyclonal anti-r-potDomain B antibodies inhibited 38-58% of the ATPase and ADPase activities, suggesting that the domain B from the *S.mansoni* ATPDase 2 is a new target for inhibitor design. Serum samples from patients with schistosomiasis were tested in ELISA using r-potDomain B as coating antigen. The seropositivity of the subclass IgG1 (27%, 8/30), IgG2 (27%, 8/30), IgG3 (50%, 15/30) or IgG4 (17%, 5/30) suggested that the domain B from the ATPDase 2 is potentially involved in the host immune response. The potato apyrase or r-potDomain B, emulsified in Freund Complete and Incomplete adjuvants, was inoculated in Swiss mice, increasing the IgG antibodies production, which were also reactive with soluble egg antigens (SEA). Protective immunity induced by each biomolecule was evaluated 60 days after challenge infection. No worm burden or egg number reduction was observed. Mice immunized with potato apyrase developed high IgG1 antibody levels, reactive with either biomolecules or SEA, while IgG2a antibody levels were produced in lower proportion, suggesting a tendency of a Th2 type immune response. The r-potDomain B was able to induce higher IgG2a antibody production, an immune response possibly associated to the Th1 type. Histological analyses of haematoxylin-eosin-sections obtained from mice immunized with potato apyrase, but not with r-potDomain B, showed a significant reduction in liver granuloma area as evidenced by the cells number reduction and substitution by collagen fibbers. Further studies of these biomolecules could contribute to a better understanding of host-parasite interactions, and may to be explored as new tools in schistosomiasis research.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, ATP diphosphohydrolase, potato apyrase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico do gênero <i>Schistosoma</i>	21
Figura 2	Alinhamento da estrutura primária do domínio B da apirase de batata e da ATPDase 2 de <i>S. mansoni</i>	41
Figura 3	Identificação de ATPDase 2 de <i>S. mansoni</i> usando anticorpos policlonais anti-r-potDomínio B.....	43
Figura 4	Imunoprecipitação da atividade ATP difosfohidrolásica de preparação de vermes adultos solubilizada em C12E9 por anticorpos policlonais anti-r-potDomínio B imobilizados em proteína A Sepharose.....	44
Figura 5	Imunoprecipitação da atividade fosfohidrolítica de preparação de vermes adultos solubilizada em C12E9 por anticorpos policlonais anti-r-potDomínio B diluído 1:400.....	45
Figura 6	Reatividade das subclasses de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de pacientes com esquistossomose (SM) com r-potDomínio B.....	47
Figura 7	Níveis de IgG total de camundongos Suíços previamente imunizados.....	49
Figura 8	Reatividade de anticorpos IgG1 e IgG2a de camundongos suíços pré-imunizados com a apirase de batata ou com o peptídeo recombinante r-potDomínio B e desafiados pela infecção experimental com <i>S. mansoni</i> usando apirase de batata como antígeno em ELISA.....	51
Figura 9	Reatividade de anticorpos IgG1 e IgG2a de camundongos suíços pré-imunizados com a apirase de batata ou com o peptídeo recombinante r-potDomínio B e desafiados pela infecção experimental com <i>S. mansoni</i> , usando r-potDomínio B como antígeno em ELISA.....	52
Figura 10	Reatividade de IgG total, e dos subtipos IgG1 e IgG2a, de camundongos Suíços pré-imunizados com apirase de batata ou com o peptídeo recombinante r-potDomínio B e desafiados pela infecção experimental com <i>S. mansoni</i>	54
Figura 11	Avaliação da redução nos granulomas de animais pré-imunizados com apirase de batata (A) ou com o peptídeo recombinante r-potDomínio B (B) e desafiados pela infecção experimental com <i>S. mansoni</i>	56

Figura 12	Histopatologia de cortes de fígado dos animais imunizados e infectados.....	57
Figura 13	Avaliação do perfil de células do infiltrado granulomatoso dos diferentes grupos de animais.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número médio de vermes recuperados dos animais imunizados e infectados com 50 cercárias de <i>S. mansoni</i>	55
Tabela 2	Avaliação da distribuição dos vermes entre fígado e mesentério e análise dos oogramas e percentual de proteção.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
°C	graus Celsius
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mA	Miliampere
m/v	massa/volume
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
ACRs	Apyrase Conserved Regions
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
API	Animais pré-imunizados com apirase de batata
ACF	Adjuvante Completo de Freund
AIF	Adjuvante Incompleto de Freund
DO	Densidade Ótica
DP	Desvio Padrão
EPM	Erro Padrão da Média
ELISA	“enzyme-linked immunosorbent assay” (teste imunoenzimático)
<i>g</i>	Força gravitacional
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IgG	Imunoglobulina da classe G
kDa	Quilo Dalton
MOPS	Ácido propanosulfônico 3-(N-morfolino)
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NCBI	“National Center Biotechnology Information”
OMS	Organização Mundial da Saúde

OPD	Dihidrocloreto de o-fenilenodiamina
PBS	Tampão fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoeletrico
sc	Subcutânea
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS- PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
U	Unidade de Elisa
BLASTp	"Basic Local Alignment Search Tool Protein"
C ₁₂ E ₉	éter monododecil glicol nonaetileno
E-NTPDase	Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
E-NTP	Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
NDPase	Nucleosídeo difosfato hidrolase
NTPase	Nucleosídeo trifosfato hidrolase
NTPDase	Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase
Pi	Fosfato inorgânico
RPM	Rotações por minuto
rDomB	Animais pré-imunizados com r-potDomínio B
r-potDomínio B	Antígeno de captura em ELISA
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SEA	Antígeno Solúvel de Ovo
SP	Espécie
SWAP	Antígeno Solúvel de Vermes adultos
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano

ANEXOS

A- Cartas de ética para pesquisa em humanos e animais

B- MAIA, A.C.R.G.; DETONI, M.L.; PORCINO, G.N.; **SOARES, T.V.**; GUSMÃO, M.A.N.; FESSEL, M.R.; MARQUES, M.J.; SOUZA, M.A.; COELHO, P.M.Z.; ESTANISLAU, J.A.S.; ROCHA, M.O.C.; SANTOS, M.O.; FARIA-PINTO, P.; VASCONCELOS, E.G. (2011). Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. **Developmental and Comparative Immunology**, In press. DOI: 10.1016/j.dci.2011.03.026

C- MENDES, R.G.P.R., GUSMÃO, M.A.N., MAIA, A.C.R.G., DETONI, M.L., PORCINO, G.N., **SOARES, T.V.**, JULIANO, M.A., JULIANO, L., COELHO, P.M.Z., LENZI, H.L., FARIA-PINTO, P., VASCONCELOS, E.G. (2011). Immunostimulatory property of a synthetic peptide belonging to the soluble ATP diphosphohydrolase isoform (SmATPDase 2) and immunolocalization of this protein in the *Schistosoma mansoni* egg. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **106**: 808-813.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	Apirase de batata como ferramenta de estudo de doenças parasitárias.....	15
1.2	<i>Schistosoma mansoni</i>	18
1.2.1	Ciclo biológico.....	19
1.2.2	Metabolismo.....	21
1.3	Esquistossomose.....	23
1.3.1	Diagnóstico.....	25
1.3.2	Tratamento.....	26
1.3.3	Vacina.....	28
1.4	Uso de novas biomoléculas no estudo do <i>S. mansoni</i> e da esquistossomose.....	29
2.	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivos gerais	30
2.2	Objetivos específicos	30
3.	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Reagentes.....	31
3.2	Análise bioinformática.....	31
3.3	Purificação da apirase de batata.....	32
3.4	Obtenção de r-potDomínio B e de soro imune anti- r-potDomínio B em camundongos BALB/C.....	32
3.5	Preparação de antígenos solúveis de ovos (SEA) e vermes adultos (SWAP).....	33
3.6	Ensaio de imunoprecipitação e inibição enzimática por anticorpos.....	34
3.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida e “western blots”.....	35
3.8	Seleção de soros de pacientes com esquistossomose mansoni.....	36
3.9	Quantificação de anticorpos de pacientes com esquistossomose por ELISA.....	36
3.10	Imunização de camundongos suíços com apirase de batata ou com o polipeptídeo recombinante r-potDomínio B e quantificação de anticorpos por ELISA.....	37
3.11	Infecção experimental e perfusão.....	38
3.12	Retirada de órgãos e análise histológica.....	39
3.13	Análise morfométrica.....	39
3.14	Aspectos éticos da pesquisa.....	39
4.	RESULTADOS	40
4.1	Identificação da ATPDase 2 de <i>S. mansoni</i> por anticorpos anti-r-potDomínio B.....	40
4.2	Avaliação da capacidade de anticorpos policlonais anti-r-potDomínio B inibir a atividade fosfohidrolítica de preparação de vermes adultos.....	45

4.3	Imunoreatividade cruzada entre r-potDomínio B e soros de pacientes com esquistossomose.....	46
4.4	Quantificação dos níveis de anticorpos produzidos pela imunização de camundongos suíços com apirase de batata e r-potDomínio B.....	47
4.5	Avaliação do perfil de anticorpos reativos com a apirase de batata, r-potDomínio B e SEA após infecção experimental de camundongos pré-imunizados.....	50
4.6	Contagem de vermes e ovos recuperados após infecção com <i>S. mansoni</i>	55
4.7	Avaliação dos granulomas.....	56
5.	DISCUSSÃO	60
5.1	Caracterização de r-potDomínio B como nova biomolécula para os estudos da ATPDase 2 de <i>S. mansoni</i>	60
5.2	Avaliação da apirase de batata e do r-potDomínio B em protocolo experimental de controle da esquistossomose.....	62
6.	CONCLUSÕES	68
7.	REFERÊNCIAS	69
	ANEXOS	77