

## INTERAÇÕES HIPERFINAS EM DNA E ANTICORPOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS PELA CEPA Y DE *T. cruzi* PELA TÉCNICA DE PAC.

**Andréia dos Santos Silvar, André Luis Lapolli, Artur Wilson Carbonari**

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/CRPq, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, asilva@usp.br

**Resumo-** O presente estudo investiga interações hiperfinas, pela técnica de PAC, em DNA e anticorpos de diferentes linhagens de camundongos infectados pela cepa Y de *T. cruzi*. A técnica de PAC caracteriza interações hiperfinas do campo elétrico das biomoléculas com o momento elétrico do núcleo de prova, fornecendo dessa forma, conhecimentos a respeito do comportamento dessas biomoléculas e a melhor compreensão de fenômenos biológicos relacionados com a dinâmica metabólica dos sistemas biológicos. Tendo em vista esta possibilidade utilizamos como materiais biológicos os DNAs e anticorpos de diferentes linhagens de camundongos infectados pela cepa Y de *T. cruzi* e como núcleo de prova o  $^{111}\text{In}$ . Os resultados obtidos, com amostras diluídas em água e a temperatura ambiente, demonstraram existir uma interação dinâmica entre o material biológico e o núcleo de prova, sendo que esta interação relaciona-se com o parâmetro  $\lambda$ , que provoca o decrescimento exponencial da função de perturbação. Estes resultados contribuirão grandemente para a explicação dos diferentes padrões de resposta imunológica apresentados pelas diferentes linhagens de camundongos quando infectados pela cepa Y de *T. cruzi*.

**Palavras-chave:** doença de Chagas, DNA, anticorpos, PAC, interações hiperfinas.

**Área do Conhecimento:** Biofísica.

### Introdução

A doença de Chagas é uma parasitose tecidual e hemática, de caráter endêmico em extensas regiões do continente americano. Tem evolução geralmente crônica e é causada por um protozoário flagelado, *Trypanosoma cruzi*, transmitido ao homem e a vários mamíferos sensíveis por hemípteros hematófagos da subfamília *Triatominae*. Trata-se de uma infecção de história natural muito antiga, as relações parasita-hospedeiro apresentam-se extremamente complexas, envolvendo adaptações profundas de ambos os lados, interferindo no desenvolvimento da infecção (NEVES, 1983).

Mesmo existindo muitas informações, originadas a partir da investigação clínica em humanos, a maior parte dos conhecimentos acerca da doença de Chagas deriva dos ensaios realizados com modelos animais, sendo freqüente o uso de camundongos. Os resultados encontrados na literatura com estes animais demonstram que, assim como os humanos, a doença se manifesta de forma diferente, em função das constituições genéticas do parasita, do hospedeiro e das relações entre ambos (MOULIA, et al., 1996).

As interações hiperfinas fornecem informações sobre a vizinhança atômica ao redor de um átomo de prova numa escala nanométrica por meio de interações entre os momentos do núcleo deste átomo e as cargas e spins da sua vizinhança. A técnica PAC (Correlação Angular Perturbada) consiste na observação da perturbação, devido às interações hiperfinas, do estado intermediário de

um núcleo radioativo de um átomo que ocupa uma determinada posição dentro de uma molécula ou numa estrutura cristalina, núcleo este que decai emitindo duas radiações- $\gamma$  sucessivas. A partir da medida destas interações é possível obter informações sobre a estrutura e da distribuição de cargas em torno deste núcleo (BAUER, 1985). Em sistemas biológicos as aplicações da técnica de PAC estão voltadas para o estudo do comportamento da interação de quadrupolo nuclear (NQI) devido à especificidade do ambiente biológico (LEIPERT, et al., 1968; BUTZ, 1989).

A espectroscopia de PAC tem mostrado ser uma ferramenta muito útil no estudo de biomoléculas, e não existe no Brasil nenhum grupo que a utilize neste tipo de aplicação. Assim, diante da importância de todos os aspectos acima descritos e dos avanços biotecnológicos, vimos relevância em estudar o comportamento das imunoglobulinas IgG1, IgG2a e IgG2b buscando argumentos que fortaleçam o estudo das diferentes respostas imunológicas desencadeadas pela presença ou ausência dessas imunoglobulinas que são pré-determinadas pelo DNA de cada linhagem de camundongos que está sendo estudada.

### Material e Método

Para a realização da primeira etapa dos experimentos foram utilizadas amostras de DNA das linhagens A/J e C57BL/6 que são consideradas susceptíveis e resistentes respectivamente à infecção provocada pela cepa Y de *T. cruzi*. Estas amostras foram diluídas em

água destilada, onde foi acrescentado o  $\text{InCl}_3$ , que é a ponta de prova. A ponta de prova utilizada foi o  $^{111}\text{Cd}$ , produto do decaimento por captura eletrônica do núcleo-pai  $^{111}\text{In}$ , que é obtido pela irradiação da  $^{109}\text{Ag}$  com deuteron em um acelerador ciclotron. Após a separação química dos átomos de  $\text{In}$  radioativos da matriz de prata, uma solução de cloreto de índio livre de carregador é obtida com uma concentração extremamente baixa de  $^{111}\text{In}$  (TROGER, 1999).

As primeiras amostras foram feitas da seguinte forma:

DNA - A/J:

48 $\mu\text{l}$  -  $\text{H}_2\text{O}$ d, 1  $\mu\text{l}$  - DNA e 1  $\mu\text{l}$  -  $\text{InCl}_3$ .

DNA - C57BL/6:

48 $\mu\text{l}$  -  $\text{H}_2\text{O}$ d, 1  $\mu\text{l}$  - DNA e 1  $\mu\text{l}$  -  $\text{InCl}_3$ .

Para a realização da segunda etapa dos experimentos foram utilizadas amostras de anticorpos (IgG1, IgG2a e IgG2b), diluídas em água destilada, onde foi acrescentado o  $\text{InCl}_3$ .

Estas amostras seguiram o mesmo padrão que as anteriores:

IgG1:

48 $\mu\text{l}$  -  $\text{H}_2\text{O}$ d, 1  $\mu\text{l}$  - IgG1 e 1  $\mu\text{l}$  -  $\text{InCl}_3$ .

IgG2a:

48 $\mu\text{l}$  -  $\text{H}_2\text{O}$ d, 1  $\mu\text{l}$  - IgG2a e 1  $\mu\text{l}$  -  $\text{InCl}_3$ .

IgG2b:

48 $\mu\text{l}$  -  $\text{H}_2\text{O}$ d, 1  $\mu\text{l}$  - IgG2b e 1  $\mu\text{l}$  -  $\text{InCl}_3$ .

As medidas de PAC para todas as amostras foram feitas utilizando o espectrômetro de quatro detectores cintiladores de  $\text{BaF}_2$ , ilustrado na figura 1.

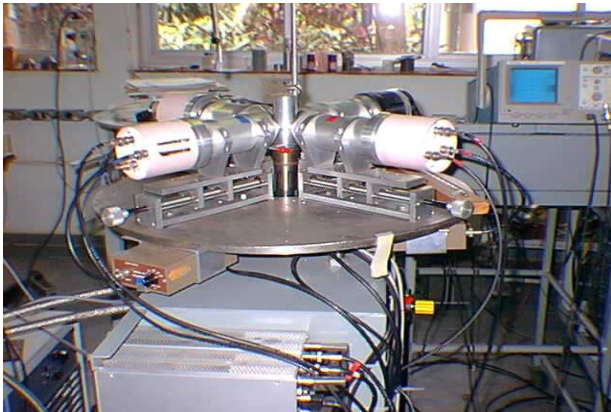


Figura 1. Espectrômetro de PAC formado com quatro detectores cônicos de  $\text{BaF}_2$ .

Os 12 espectros de coincidências  $W(\theta, t)$  acumulados no multicanal em cada medida PAC foram tratados por um programa de computador que gerou uma curva de  $A_{22}G_{22}(t)$ , dada por uma combinação dos espectros  $W(\theta, t)$ :

$$A_{22}G_{22}(t) = 2 \frac{C(180^\circ, t) - C(90^\circ, t)}{C(180^\circ, t) + 2C(90^\circ, t)}$$

onde,

$$C(180^\circ, t) = \sqrt[8]{\prod_{i=1}^8 W_i(180^\circ, t)} \text{ e}$$

$$C(90^\circ, t) = \sqrt[4]{\prod_{i=1}^4 W_i(90^\circ, t)}$$

sendo  $W_i(\theta, t)$  os espectros de coincidências para as diversas combinações de detectores nos ângulos  $\theta = 90^\circ, 180^\circ$  subtraídos os efeitos devidos a eventos de coincidências acidentais  $W_A(t)$ :  $W_i(\theta, t) = W_i(\theta, t) - W_A(t)$ .

A partir da curva de  $A_{22}G_{22}(t)$  foi possível obter as frequências de transição  $\omega_i$  correspondentes ao desdobramento em energia do nível intermediário da cascata gama do núcleo de prova devido à presença do gradiente de campo elétrico originado pela vizinhança eletrônica (KARLSSON, et al., 1965).

As medidas de PAC com biomoléculas são realizadas em solução, condição na qual sofrem o efeito da difusão rotacional que é representada pelo tempo de correlação rotacional  $\tau_{CR}$ , que descreve a mobilidade de uma molécula numa solução. Este tempo depende da viscosidade  $\xi$ , da temperatura absoluta  $T$  e do volume da molécula  $V$  e é definido por  $\tau_{CR} = V \cdot \xi / (k_B T)$ , onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann (ABRAGAM; POUND, 1953).

A influência da interação dinâmica é mais forte quando  $\omega_0 \tau_{CR} \approx 1$ . Neste caso o efeito sobre a correlação angular será um rápido amortecimento da anisotropia como função do tempo. Há outras duas situações possíveis: (1) a flutuação da interação quadrupolar é rápida, definida por  $\omega_0 \tau_{CR} \ll 1$ , ou seja quando o tempo de flutuação é curto comparado com a escala de tempo estabelecida pela interação quadrupolar caracterizada por  $\omega_0$ , o núcleo perde a coerência de fase e a função de perturbação se torna um simples decaimento exponencial, (2) no regime de flutuação da interação quadrupolar lenta, definida por  $\omega_0 \tau_{CR} \gg 1$ , ou seja quando o tempo de flutuação é longo comparado com a escala de tempo estabelecida pela interação quadrupolar, o efeito sobre a correlação angular será um lento amortecimento da anisotropia. No limite  $\tau_{CR} \rightarrow \infty$ , a interação será puramente estática. Somente neste caso é possível determinar simultaneamente tanto  $\omega_0$  e  $\eta$  (assimetria) que são os parâmetros hiperfinos relacionados com a estrutura local do sítio do núcleo de prova na biomolécula.

Foram realizadas medidas a temperatura ambiente e a temperatura do nitrogênio líquido 77K.

## Resultados

Os resultados estão apresentados nas figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 onde se observam os espectros

de interações hiperfinas para o núcleo de prova  $^{111}\text{Cd}$  com as moléculas de DNA e anticorpos. As amostras foram medidas à temperatura ambiente e à temperatura do nitrogênio líquido 77 K. Os espectros de coincidência foram reduzidos utilizando-se o programa TDPAC, desenvolvido no Laboratório de Interações Hiperfinas (LIH) do IPEN e analisados pelo programa PACFIT, desenvolvido no Laboratório de Correlação Angular do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

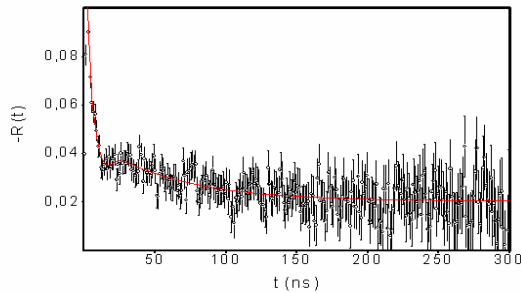


Figura 2. Espectro interação hiperfina para a linhagem A/J com ponta de prova  $^{111}\text{Cd}$  a 295K.

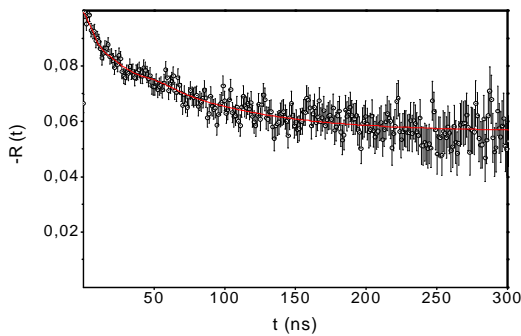


Figura 3. Espectro interação hiperfina para a linhagem C57BL/6 com ponta de prova  $^{111}\text{Cd}$  a 295K.

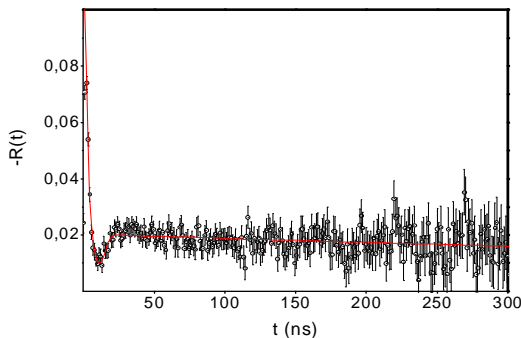


Figura 4. Espectro interação hiperfina para a linhagem C57BL/6 com ponta de prova  $^{111}\text{Cd}$  a 77K.

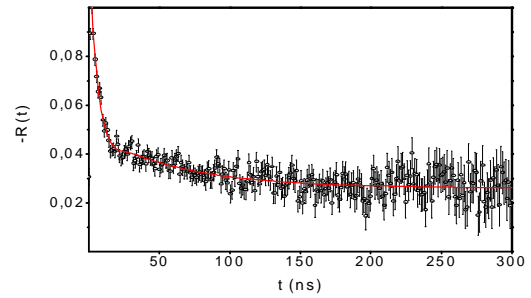


Figura 5. Espectro interação hiperfina para o anticorpo IgG1 com ponta de prova  $^{111}\text{Cd}$  a 295K.

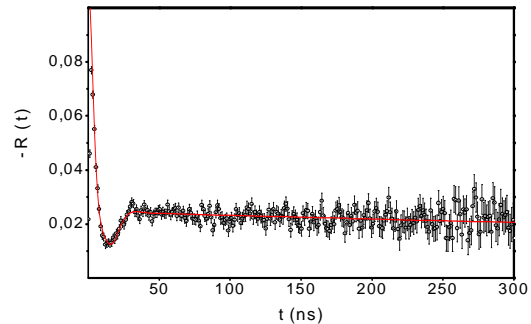


Figura 6. Espectro interação hiperfina para o anticorpo IgG2a com ponta de prova  $^{111}\text{Cd}$  a 295K.

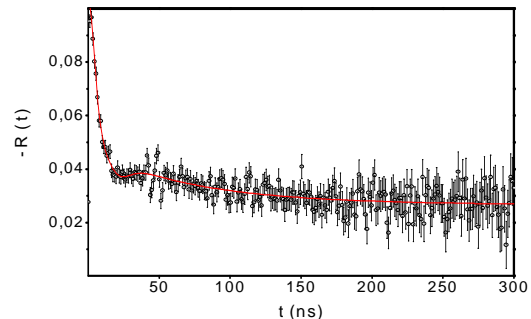


Figura 7. Espectro interação hiperfina para o anticorpo IgG2b com ponta de prova  $^{111}\text{Cd}$  a 295K.

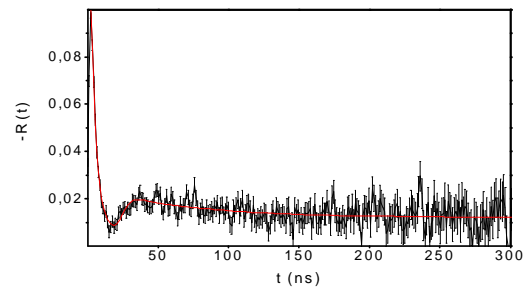


Figura 8. Espectro interação hiperfina para o anticorpo IgG2b com ponta de prova  $^{111}\text{Cd}$  a 77K.

## Discussão

Os resultados apresentados, neste trabalho, são preliminares. Desta forma, será feita uma análise apenas qualitativa, tendo em vista a necessidade da realização de medidas com maior estatística para uma análise mais detalhada.

As figuras 2, 3, 5 e 7 em que as amostras foram medidas a temperatura ambiente, descrevem uma interação dinâmica onde a flutuação da interação quadrupolar foi rápida. Resultando num simples decaimento exponencial.

Na figura 6, a amostra também foi medida a temperatura ambiente, porém, esta não apresentou o mesmo comportamento que as anteriores. Neste caso, a flutuação da interação quadrupolar foi lenta, resultando num lento amortecimento da anisotropia.

Já as figuras 4 e 6 que foram medidas a temperatura do nitrogênio líquido 77K, descreveram uma interação puramente estática, onde a flutuação da interação quadrupolar foi muito lenta ou nem existiu pelo fato da amostra estar congelada.

Os resultados obtidos demonstram, qualitativamente, a existência de uma interação dinâmica entre o material biológico e o núcleo de prova. Observou-se também, uma variação sistemática do parâmetro de difusão rotacional dependendo do tipo de molécula estudada e da temperatura em que o sistema foi submetido, mostrando que o núcleo de prova se ligou em algum sítio da molécula.

## Conclusão

Dando continuidade ao trabalho, serão realizadas medidas mais detalhadas além de simulação computacional (DANIELSEN, et al., 2002) com o objetivo de definir-se com relativa precisão o local de fixação do núcleo de prova.

Estes resultados contribuirão de forma relevante para a explicação dos diferentes padrões de resposta imunológica apresentados pelas diferentes linhagens de camundongos quando infectados pela cepa Y de *T. cruzi*.

## Referência

- ABRAGAM, A; Pound, R. V. Influence of electric and magnetic fields on angular correlations. **Phys Rev.** 92, 943-962, 1953.
- BAUER, R., Perturbed angular correlation spectroscopy and its application to metal sites in proteins: possibilities and limitations, **Quarterly Review Biophysics** 18, 1-64, 1985.

- BUTZ, T. Analytic perturbation function for static interaction in perturbed angular correlations of  $\gamma$ -rays. **Hyperfine Interactions** 52, 189-228, 1989.

- DANIELSEN, E; JORGENSEN, L. E; SESTOFT, P. Monte Carlo Simulations of PAC-Spectra as a General Approach to Dynamic Interactions. **Hyperfine Interact.** 142, 607-626, 2002.

- KARLSSON, E; MATTHIAS, E; SIEGBAHN, S. "Perturbed Angular Correlation" **North-Holland, Amsterdam**, 1965.

- LEIPERT, T. K; BALDESCHWIELER, J. D; SHIRLEY, D. A. Applications of gamma ray angular correlations to the study of biological macromolecules in solutions. **Nature.** 200, 907-909, 1968.

- MOULIA, C; LE BRUN, N; RENALD, F. Mouse-Parasite Interactions: from gene to population. **Adv. in Parasitol.** 38: 119 - 167, 1996.

- NEVES, J. Diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., p. 694-722, 1983.

- TROGER, W. Nuclear probes in life sciences. **Hyperfine Interact.** 120, 117-128, 1999.