

## AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE RESPOSTA DE IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES LINHAGENS DE CAMUNDONGOS FRENTE À INFECÇÃO POR *T. cruzi*

**Andréia dos Santos Silva<sup>1</sup>, Luiz Augusto Corrêa Passos<sup>2</sup>, Nanci do Nascimento**

<sup>1</sup>Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/CB, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, asilva@usp.br

<sup>2</sup>Unicamp/Instituto de Biologia, Rua Monteiro Lobato, 255, passos@cemib.unicamp.br

**Resumo-** O presente trabalho foi realizado com diferentes linhagens de camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, objetivando avaliar a resposta imunológica por elas apresentada. Os resultados mostraram que todas as linhagens apresentaram uma resposta superior para IgG2a e IgG2b, quando comparados ao IgG1, indicando um padrão Th1 que expressa resposta imunológica celular. Animais da linhagem C57BL/6 mostraram-se resistentes à infecção, enquanto que os animais da linhagem A/J mostraram-se susceptíveis. Os animais da linhagem B6AF1 (híbrido) foram mais resistentes à infecção que seu parental original C57BL/6, apresentando traços tanto do parental original A/J quanto do C57BL/6. Os animais da linhagem BXA1 foram considerados resistentes à infecção, mas não apresentaram o mesmo controle observado nos animais das linhagens B6AF1 e C57BL/6. Os animais da linhagem BXA2 foram considerados susceptíveis à infecção, mas apresentaram maior controle que o observado na linhagem A/J. Os resultados obtidos indicam que a subclasse de imunoglobulinas IgG2b desempenha importante papel na resistência à cepa Y de *T. cruzi*.

**Palavras-chave:** *T. cruzi*, resistência, susceptibilidade.

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas.

### 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* (NEVES, 1983).

No início do século XX, esta doença era uma enzootia presente em populações de animais silvestres, de espécies variadas. As mudanças no ambiente, decorrentes da ocupação humana, modificaram este panorama, agravando o problema do ponto de vista epidemiológico. Cerca de 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas e o número de pessoas expostas ao risco chaga a 100 milhões. Esta tripanossomíase está entre os principais problemas de saúde da América do Sul, afetando milhões de pessoas, apresentando alto impacto na morbidade e mortalidade (WHO, 2003).

A observação da acentuada diferença na resistência de pessoas infectadas com *T. cruzi*, conduziu à hipótese de que a constituição genética do hospedeiro poderia influenciar o desenvolvimento da doença e a sobrevivência dos doentes (PASSOS, 2003). A análise das infecções experimentais com o *T. cruzi*, empregando linhagens de camundongos, revelou a importância da constituição genética do hospedeiro na sobrevivência e apontou para a necessidade de se realizar experimentos especificamente desenhados, com o propósito de esclarecer a influência de genes envolvidos no fenômeno da

resistência (WRIGHTSMAN *et al*, 1982; CORSINI *et al*, 1980).

Com o objetivo de contribuir acrescentando novos dados experimentais ao assunto, este trabalho apresenta resultados obtidos sobre o padrão de respostas de imunoglobulinas em diferentes linhagens de camundongos resistentes e susceptíveis à infecção por *T. cruzi*.

### Material e Método

Foram utilizadas formas de cultivo de cepa Y de *T. cruzi* para purificação de antígeno empregado nos ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Estas cepas foram cedidas pela Dra. Eufrosina S. Umezawa do Laboratório de Protozoologia do IMT – FMUSP – SP, as quais foram cultivadas no meio LIT com soro fetal bovino (S. F. B.) a 10% sem antibiótico e incubadas à temperatura de 26°C em estufa do tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio (D. B. O.).

Foram também utilizadas formas sangüícolas da cepa Y de *T. cruzi*, provenientes do Departamento de Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, cedidas pelo Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos, para os testes de infecção. Animais das linhagens A/J, C57BL/6, B6AF1, BXA1e BXA2 oriundos de Colônias do CEMIB/UNICAMP, com idade de 8 a 12 semanas foram infectados com 10<sup>4</sup> tripomastigotas a fim de diferenciar uma linhagem susceptível e outra resistente à infecção por *T. cruzi*. O inoculo dos tripomastigotas foi via intraperitoneal.

Animais A/J e C57BL/6 são os parentais originais de fenótipos susceptível e resistente

respectivamente. Animais B6AF1 são animais híbridos oriundos do acasalamento entre fêmeas da linhagem C57BL/6 e machos da linhagem A/J. Animais BXA1 e BXA2 são recombinantes isogênicos, obtidos a partir de misturas ao acaso do genoma de duas linhagens isogênicas parentais, fixadas com o acasalamento entre dois indivíduos F1, na forma *intercross*, por 20 gerações.

A constatação da infecção foi feita entre o 7° e o 14° dia após o inóculo e a mortalidade foi acompanhada diariamente por um período superior a trinta dias (PASSOS, 2003).

Feita a constatação da parasitemia, foram realizadas sangrias e o soro obtido foi utilizado para a realização dos ensaios imunoenzimáticos. O soro utilizado nestes ensaios foi diluído 1/50 $\mu$ l e o conjugado de peroxidase IgG anti-IgG1, IgG2a e IgG2b, foi diluído 1/10000 $\mu$ l em solução de bloqueio.

## Resultados

Os experimentos realizaram-se com a 1° sangria pois, somente nela é possível demonstrar o padrão de resposta encontrado na linhagem A/J, que morre num período inferior a 11 dias após a infecção, e com a 6° sangria pois nesta encontrou-se um padrão superior entre as demais sangrias testadas.

Os gráficos que seguem mostram os resultados encontrados com os testes realizados para avaliação de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b realizados com soros provenientes da 1° e 6° sangrias.

O ensaio imunoenzimático com a linhagem de animais A/J realizou-se com soro proveniente da 1° sangria após a infecção por *T. cruzi*.

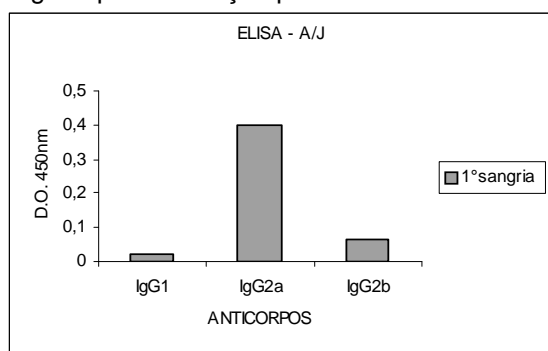


GRÁFICO 1 – Ensaio imunoenzimático para avaliação da produção de anticorpos específicos (IgG1, IgG2a e IgG2b) com soro proveniente da 1° sangria de animais da linhagem A/J.

O ensaio imunoenzimático com a linhagem de animais C57BL/6 realizou-se com soro proveniente da 1° e da 6° sangria após a infecção por *T. cruzi*.

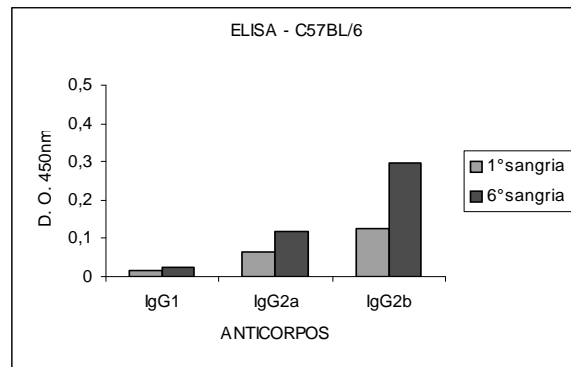


GRÁFICO 2 – Ensaio imunoenzimático para avaliação da produção de anticorpos específicos (IgG1, IgG2a e IgG2b) com soro proveniente da 1° e 6° sangria de animais da linhagem C57BL/6.

O ensaio imunoenzimático com a linhagem de animais B6AF1 realizou-se com soro proveniente da 1° e da 6° sangria após a infecção por *T. cruzi*.

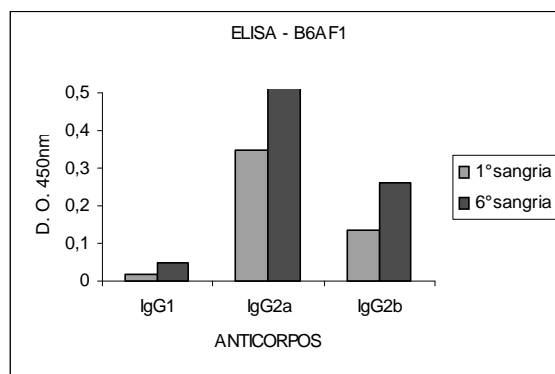


GRÁFICO 3 – Ensaio imunoenzimático para avaliação da produção de anticorpos específicos (IgG1, IgG2a e IgG2b) com soro proveniente da 1° e 6° sangria de animais da linhagem B6AF1.

O ensaio imunoenzimático com a linhagem de animais BXA1 realizou-se com soro proveniente da 1° e da 6° sangria após a infecção por *T. cruzi*.

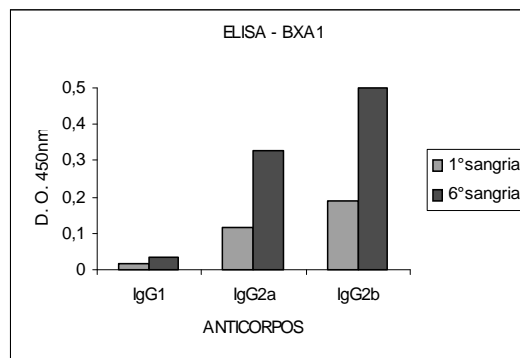


GRÁFICO 4 – Ensaio imunoenzimático para avaliação da produção de anticorpos específicos (IgG1, IgG2a e IgG2b) com soro proveniente da 1° e 6° sangria de animais da linhagem BXA1.

O ensaio imunoenzimático com a linhagem de animais BXA2 realizou-se com soro proveniente da 1° e da 6° sangria após a infecção por *T. cruzi*.

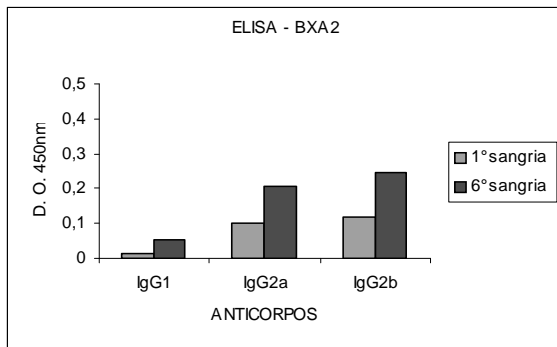


GRÁFICO 5 – Ensaio imunoenzimático para avaliação da produção de anticorpos específicos (IgG1, IgG2a e IgG2b) com soro proveniente da 1ª e 6ª sangria de animais da linhagem BXA2.

## Discussão

A maior parte dos conhecimentos acerca da doença de Chagas deriva dos ensaios realizados com modelos animais, sendo freqüente o uso de camundongos. As linhagens isogênicas de camundongos são, em geral, a primeira escolha para o desenvolvimento de programas de investigação genética, uma vez que, por apresentarem uma homozigose em cerca de 99% dos alelos, respondem de forma homogênea oferecendo resultados universais e reprodutivos (BECK *et al*, 2000; PASSOS, 2003).

Passos e colaboradores (2002) mostraram que diferentes concentrações de *T. cruzi* eram capazes de selecionar animais quanto à resistência ao *T. cruzi*. A linhagem C57BL/6 foi considerada resistente, pois sobreviveu a um período superior a 30 dias após o inóculo de  $10^4$  tripomastigotas. A linhagem A/J foi considerada susceptível, pois, seus representantes não sobreviveram a um período superior a 11 dias após o inóculo de  $10^1$  tripomastigotas.

Para determinar o comportamento frente ao *T. cruzi*, de uma progênie derivada dessas linhagens parentais (C57BL/6 e A/J), foram realizados acasalamentos programados e os descendentes foram submetidos a diferentes concentrações de tripomastigotas por animal. Esta população de híbridos B6AF1 tem a característica de ser homogênea, possibilitando um padrão único de resposta, uma vez que cada metade de sua constituição genética corresponde aos parentais resistente e susceptível (PASSOS, 2003).

Para a avaliação do padrão de resposta de imunoglobulinas, amostras dos soros das linhagens A/J, C57BL/6, B6AF1, BXA1 e BXA2 foram analisados pelo método de ELISA.

De acordo com os resultados dos ensaios imunoenzimáticos apresentados, pode-se dizer, que de um modo geral todas as linhagens apresentaram um padrão de resposta superior quando testadas com IgG2a e IgG2b, se comparados com os resultados encontrados

quando testados com IgG1. Imunoglobulinas IgG1 implicam num padrão de resposta do tipo Th2 que expressa respostas imunológicas alérgicas, enquanto que imunoglobulinas IgG2 implicam num padrão de resposta Th1 que expressa respostas imunológicas celulares.

Animais da linhagem A/J apresentaram padrão de resposta IgG2a, superior àquele apresentado pela linhagem C57BL/6 e pelo híbrido B6AF1 quando infectados pelo *T. cruzi*, revelando uma resposta celular imediata.

Os animais da linhagem C57BL/6 apresentaram IgG2b mais elevada que as outras linhagens, revelando uma resposta imunológica celular mais tardia. Esses animais conseguem controlar a infecção aguda podendo favorecer a cura ou influenciar o desenvolvimento da forma cardíaca da doença.

Animais da linhagem B6AF1 apresentam um padrão de resposta inicial semelhante ao seu parental original A/J, ou seja, apresentam como resposta principal IgG2a, porém, esses animais potencialmente podem controlar a infecção, pois herdaram de seu parental original C57BL/6 regiões relacionadas com a resistência e é por isso que a resposta IgG2b é semelhante àquela encontrada nos animais da linhagem C57BL/6. Esses animais, portanto, são mais resistentes que seu parental original C57BL/6.

Animais BXA1 apresentam um padrão de resposta inicial semelhante aos animais da linhagem C57BL/6, ou seja, tem como resposta principal IgG2b, porém apresentam IgG2a em quantidade significativa, sendo, no entanto, inferior àquela apresentada pela linhagem A/J. Isso mostra que o padrão de resposta por ela apresentado preserva tanto traços da linhagem resistente como da susceptível. Assim, essa linhagem apresenta um padrão de resposta intermediário, não sendo tão resistente quanto os representantes das linhagens B6AF1 e C57BL/6, mas, resistindo à infecção por *T. cruzi* por um período superior aquele apresentado pela linhagem A/J.

Animais da linhagem BXA2 apresentam em sua resposta IgG2a e IgG2b quase na mesma proporção. Esses animais podem ser considerados susceptíveis a infecção por *T. cruzi*, porém permanecem vivos durante um período superior àquele apresentado pela linhagem A/J, provavelmente por produzirem uma resposta tardia decorrente de IgG2b, contrastando com a linhagem parental de fenótipo susceptível que não consegue desenvolver este mecanismo. Assim, não resistem à infecção de forma tão acentuada quanto os animais das linhagens B6AF1 e C57BL/6, mas, conseguem controlar a infecção e sobreviver a ela por um período superior a 30 dias, indicando a importância da subclasse IgG2b na resistência à infecção por *T. cruzi*.

## Conclusão

- Todas as linhagens infectadas com *T. cruzi* apresentaram padrão de resposta imunológica celular.
- A linhagem C57BL/6, infectada com *T. cruzi*, apresentou padrão de resposta predominantemente IgG2b
- A linhagem A/J, infectada com *T. cruzi*, apresentou padrão de resposta predominantemente IgG2a.
- Os animais da linhagem B6AF1, são mais resistentes à infecção por *T. cruzi* que seu parental original C57BL/6. Sua resposta imunológica apresenta traços tanto do parental original A/J quanto do C57BL/6.
- Os animais da linhagem BXA1 podem ser considerados resistentes à infecção por *T. cruzi*, mas não apresentam o mesmo controle sobre a infecção apresentado pelos animais das linhagens B6AF1 e C57BL/6.
- Os animais da linhagem BXA2 podem ser considerados susceptíveis à infecção por *T. cruzi*, mas controlam a infecção por um período maior, sobrevivendo assim, por mais tempo que os animais da linhagem A/J.
- O padrão de resposta IgG2b está diretamente relacionado com a resistência dos camundongos à cepa Y de *T. cruzi*.
- O padrão de resposta IgG2a isolado não confere resistência à cepa Y de *T. cruzi*.

## Referências

- BECK, J.A.; LLOYD, S.; HAFEZPARASAT, M.; PIERCE, M. L.; EPPIG, J.T.; FESTING, F.W.; FISCHER, M.C. Genealogies of inbred strains. **Nature Genetics**. 24: 23 - 25, 2000.
- CORSINI, A.C.; COSTA, M.G.; OLIVEIRA, O.L.; CAMARGO, I.J.; STELINI, A. JR. Susceptibility of inbred strain mice to *Trypanosoma cruzi* strain Y. **Rev. Inst. Med.Trop.** São Paulo. 22(4): 192 - 6, 1980.
- NEVES, J. Diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., p. 694-722, 1983.
- PASSOS, L.A.C.; SAKURADA, J.; GUARALDO, A.M.A.; ORTIZ, S.C.B.C.; RANGEL, H.A.; GUENET, J. L. Chagas: Fenômeno da Resistência. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. (5): 26-31, 2002.
- PASSOS, L. A. C. Análise do determinismo Genético da resistência de camundongos infectados experimentalmente com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. 2003. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Campinas.

- WHO. Global defense against the infectious disease threat. Ed. Mary Kay Kindhauser. **World Health Organization**, Geneve, 2003.

- WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S.M.; WATSON, J. Genetic Control of Responses to *Trypanosoma cruzi* in Mice: Multiple Genes Influencing Parasitemia and Survival. **Infection and Immunity**. 36(2):637-644, 1982.