

## DINÂMICA DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE CÃES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM A CEPA “Y” DE *Trypanosoma cruzi*

Simone Baldini Lucheis<sup>1</sup>  
Veruska Maia da Costa<sup>2</sup>  
Juliano Leônidas Hoffmann<sup>3</sup>  
Marcella Zampoli Troncarelli<sup>4</sup>  
Helio Langoni<sup>5</sup>

### RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a dinâmica da resposta imune humoral de dois cães experimentalmente infectados com a cepa “Y” de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), visando identificar a ocorrência de soroconversão e a respectiva variação de títulos de anticorpos. Para tanto, foram colhidas amostras de sangue dos animais semanalmente, durante 56 semanas, e a detecção de anticorpos foi realizada por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Na primeira semana após a inoculação não foram detectados anticorpos em ambos animais. Um cão apresentou anticorpos com aumento gradual de títulos a partir da 2ª semana, atingindo título máximo de 1.280 após quatro semanas de inoculação. Os títulos declinaram entre a quarta e quinta semanas, atingindo de 80 a 320 até a 56ª semana. No outro cão, o pico de anticorpos foi detectado entre a 11ª e 13ª semanas, quando então os títulos começaram a declinar. Logo após, identificou-se um novo pico entre a 22ª e 23ª semanas, com título máximo de 640. A partir da 25ª semana verificou-se tendência à estabilização, com títulos variando de 80 a 320. Na última semana o título manteve-se em 80. Este estudo demonstra que cães experimentalmente inoculados com a cepa “Y” de *T. cruzi* desenvolvem rápida resposta imune e produzem elevados títulos de anticorpos. Considerando os limites éticos de um delineamento científico, estes animais podem ser utilizados como modelos experimentais em estudos da história natural e imunopatologia da doença de Chagas, bem como na produção de anti-soros para fins diagnósticos.

**Palavras-chave:** sorologia, cães, *Trypanosoma cruzi*.

### IMMUNE RESPONSE DYNAMICS OF EXPERIMENTALLY INFECTED DOGS WITH *Trypanosoma cruzi* “Y” STRAIN

#### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the dynamics of humoral immune response of two dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* “Y” strain, in order to identify the seroconversion and the antibody titles variation. Animal’s blood samples were collected weekly, during 56 weeks and indirect immunofluorescence test (IIF) was carried out for anti-*T. cruzi* antibodies detection. On the first week after inoculation antibodies were not detected

<sup>1</sup> Pesquisadora Científica da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) Pólo Centro Oeste, Av. Rodrigues Alves, 40-40, 17030-000, Bauru, São Paulo, Brasil. silucheis@apta.sp.gov.br

<sup>2</sup> Mestre em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP/Botucatu-SP verusket@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Mestre em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina – UNESP – Botucatu/SP hoffmannvet@hotmail.com

<sup>4</sup> Doutoranda da Área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP/Botucatu-SP matroncarelli@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Professor Titular do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ-UNESP-Botucatu. Distrito de Rubião Junior, s/n. CEP: 18.618-000. Fone: (14) 3811-6270. hlangoni@fmvz.unesp.br

in any animals. One dog produced antibodies with gradual titers increase after the second week, achieving a maximum titer of 1,280 after four weeks of inoculation. Titers declined between the fourth and fifth weeks, ranging from 80 to 320 up to the 56<sup>th</sup> week. In the other dog, antibodies output peak was verified between the 11<sup>th</sup> and 13<sup>th</sup> weeks and then titers started to decrease. Soon after, a new peak was observed between the 22<sup>nd</sup> and 23<sup>rd</sup> weeks, with a maximum titer of 640. From the 25<sup>th</sup> week on, it was verified a stabilization tendency, with titers ranging from 80 to 320. In the last week, titer was kept in 80 in both dogs. This study shows that dogs experimentally inoculated with *T. cruzi* "Y" strain develops a quick immune response, and produce high antibodies titles. Considering the ethical limits of an experimental design, these animals can be used as experimental models in studies of the natural history and immunopathology of Chagas disease, and also for antiserum production.

**Key words:** serology, dogs, *Trypanosoma cruzi*.

## DINAMICA DE LA RESPUESTA INMUNE DE PERROS EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS CON LA CEPA "Y" DE *Trypanosoma cruzi*

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la dinámica de la respuesta inmune humoral de dos perros experimentalmente infectados con la cepa "Y" de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), para la identificación de la ocurrencia de soroconversión y e la respectiva variación de títulos de anticuerpos producidos. Fueron colectadas muestras de sangre de los animales, semanalmente, durante 56 semanas y la detección de anticuerpos fue realizada por medio de la Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta (RIFI). En la primera semana después de la inoculación no fueron detectados anticuerpos en ambos animales. Un perro presentó anticuerpos con aumento gradual de títulos a partir de la segunda semana, alcanzando título máximo de 1.280 después de cuatro semanas de inoculación. Los títulos declinaran entre la cuarta y la quinta semanas, alcanzando de 80 al 320 hasta la 56<sup>a</sup> semana. En el otro perro, el pico de anticuerpos fue detectado entre la 11<sup>a</sup> y 13<sup>a</sup> semanas, cuando los títulos empezaran a declinar. Luego después, se identifico un nuevo pico entre la 22<sup>a</sup> y 23<sup>a</sup> semanas, con título máximo de 640. A partir de la 25<sup>a</sup> semana se verifico la tendencia a la estabilización, con títulos variando de 80 a 320. En la última semana el título se mantuvo en 80. Este estudio muestra que perros experimentalmente inoculados con la cepa "Y" de *T. cruzi* desarrollan rápida respuesta inmune y producen elevados títulos de anticuerpos. Considerando los límites éticos de un delineamiento científico, estos animales pueden ser utilizados como modelos experimentales en estudios de la historia natural e inmunopatología del mal de Chagas, y también en la producción de anti-sueros para usos diagnósticos.

**Palavras-clave:** serología, perros, *Trypanosoma cruzi*.

### INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), protozoário flagelado da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*. Trata-se de uma zoonose prevalente nas Américas, com estimativa de 90 milhões de indivíduos sob risco de infecção. Várias espécies de mamíferos constituem-se em reservatórios importantes de *T. cruzi*, principalmente os cães, tendo em vista que estes animais são frequentemente fontes de alimentação para os triatomíneos domésticos (1, 2, 3).

*T. cruzi* mobiliza múltiplos mecanismos humorais e celulares da resposta imune inata e adquirida e, em conseqüência, o parasita passa a ser continuamente combatido, tendo a sua multiplicação reduzida nos tecidos do hospedeiro (4). A infecção experimental por *T. cruzi* em cães tem sido realizada em diversos estudos, demonstrando que a evolução da doença ocorre de maneira semelhante àquela verificada em humanos (5, 6). Por este motivo, os cães têm sido utilizados como modelos experimentais em estudos da história natural e imunopatologia da doença de Chagas.

Com base no exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a dinâmica da resposta imune humoral em dois cães experimentalmente infectados com a cepa “Y” de *T. cruzi*, visando identificar a ocorrência de soroconversão e a respectiva variação de títulos de anticorpos produzidos durante determinado período de tempo.

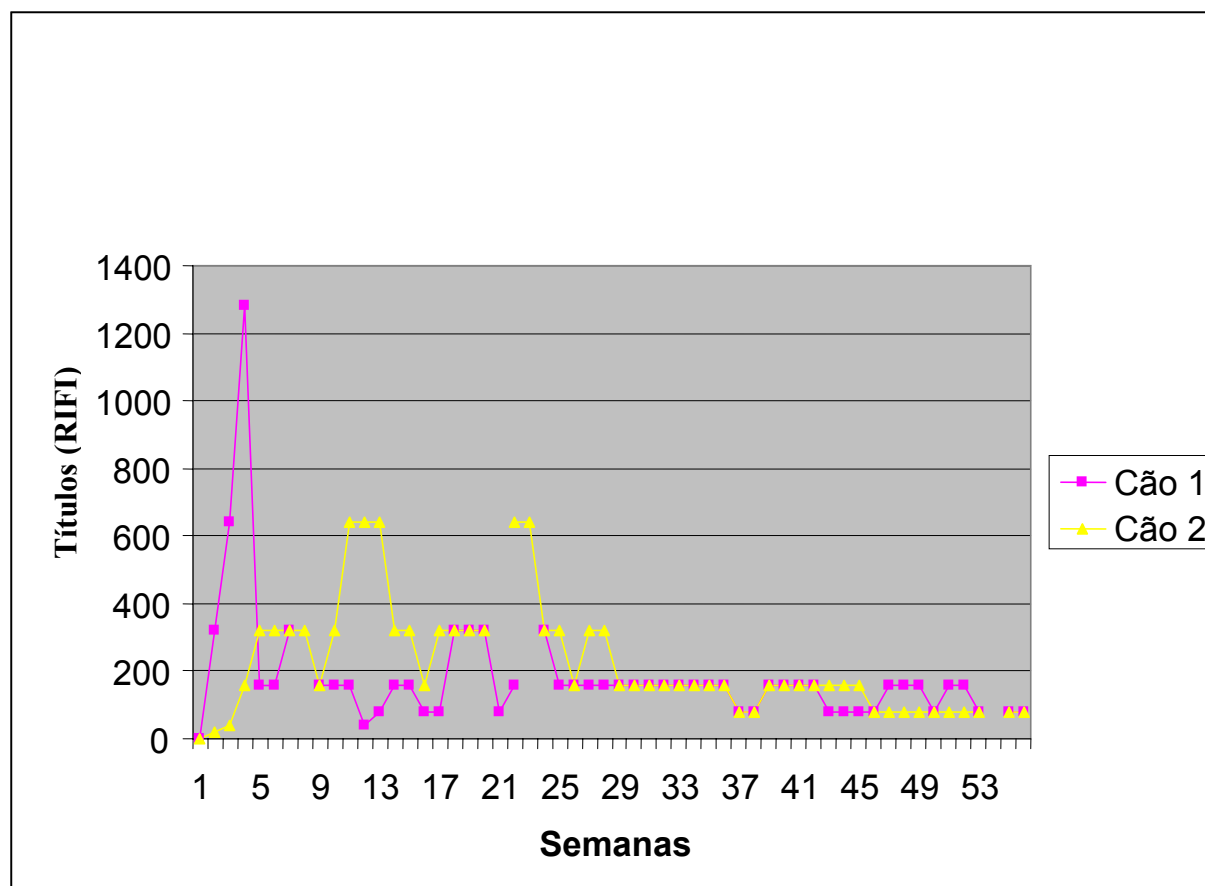
## MATERIAL E MÉTODOS

Dois cães machos, adultos, sem raça definida, foram inoculados com a cepa “Y” de *T. cruzi*, procedente do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, e mantida em meio de cultura LIT (Liver Infusion Tryptose) no Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu-SP. A via utilizada para inoculação foi a intraperitoneal, com 375µL do antígeno (formas tripomastigotas), diluído em 1.625µL de tampão fosfato salina (PBS, pH 7,2) estéril (7). Semanalmente, foram colhidas amostras de sangue dos cães (5mL), por punção veno-cefálica, durante 56 semanas. As amostras foram encaminhadas ao laboratório, onde foram centrifugadas a 3590 g durante 10 minutos, para a obtenção de soro. Estes foram alíquotados em microtubos de 1,5 mL e armazenados a -20°C, até processamento.

As amostras de soro obtidas foram submetidas à técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), para a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* (3). O antígeno utilizado foi a própria cepa “Y” de *T. cruzi*, cultivada em meio LIT, impregnada em lâminas de imunofluorescência. As amostras de soro foram sucessivamente diluídas de 1:20 a 1:640 e os anticorpos IgG foram detectados pela adição de conjugado anti-IgG de cão (F7884 Sigma®). O ponto de corte adotado foi o título 20 (3, 8). Em caso de fluorescência na diluição de 640, a amostra de soro era então diluída e o título final considerado foi a última diluição do soro onde se observou fluorescência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da curva sorológica de ambos animais estão representados em conjunto na Figura 1. Na primeira semana pós-inoculação não foi detectada produção de anticorpos em ambos animais. Para o cão 1, houve início de produção de anticorpos e aumento gradual dos títulos a partir da segunda semana, alcançando título máximo de 1.280 na quarta semana pós-inoculação. Os títulos declinaram entre a quarta e quinta semanas e oscilaram entre 80 e 320 até a 56ª semana. As amostras deste cão colhidas na 8ª, 23ª e 54ª semanas estavam impróprias para a realização da sorologia, por isso foram desprezadas. O cão 2 apresentou pico de produção de anticorpos entre a 11ª e 13ª semanas, com queda e produção de um novo pico entre 22ª e 23ª semanas, com título máximo de 640. A partir da 25ª semana verificou-se tendência de estabilização em ambos os cães, com variação dos títulos entre 80 e 320, mantendo-se em 80 nas últimas semanas, nos dois animais. As amostras do cão 2, colhidas na 21ª e 54ª semanas, estavam impróprias para a realização da sorologia, por isso foram desprezadas.



**FIGURA 1.** Dinâmica de anticorpos produzidos pelos cães 1 e 2 em resposta à inoculação experimental com a cepa “Y” de *Trypanosoma cruzi*. Botucatu-SP, 2008.

Em estudo de infecção experimental em cães da raça Beagle, utilizando a cepa “Y” de *T. cruzi*, realizado por Guedes et al. (6) a detecção de IgG ocorreu mais tardiamente – a partir da quarta semana pós-infecção, quando os títulos de anticorpos começaram a aumentar progressivamente até a 10<sup>a</sup> semana, estabilizando-se até o final do experimento (100 semanas).

Como ocorre em outras infecções por microrganismos patogênicos intracelulares, a infecção do hospedeiro pelo *T. cruzi* mobiliza múltiplos mecanismos humorais e celulares da resposta imune inata (natural) e adquirida (adaptativa). Em consequência, o parasita passa a ser continuamente combatido e tem a sua multiplicação reduzida nos tecidos do hospedeiro. No entanto, ele persiste indefinidamente, assim como a resposta imune (9).

Em estudo de reinfecção experimental em cães, com duas cepas brasileiras de *T. cruzi* (147 e SC-1), a sorologia pela RIFI detectou altos níveis de IgG em animais infectados/reinfectados pelo parasita (10). Além disso, os títulos detectados em animais reinfectados permaneceram elevados, independentemente do tipo de cepa utilizada na primoinfecção, e apresentaram perfis semelhantes durante todo o período de estudo (38 meses). Entre os cães que foram infectados somente uma vez, o perfil sorológico foi bastante similar. À semelhança do que foi observado no presente estudo, os níveis de anticorpos detectados naqueles animais decresceram ao longo dos meses de observação, sem se tornarem negativos. Os níveis de anticorpos detectados durante a fase crônica foram superiores nos cães que foram reinoculados que nos cães infectados uma única vez.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, bem como na literatura apresentada, é possível concluir que cães experimentalmente inoculados com a cepa “Y” de *T.*

*cruzi* soroconvertem rapidamente, produzindo elevados títulos de anticorpos, podendo ser utilizados como modelos em estudos da história natural e imunopatologia da doença de Chagas, bem como para a produção de anti-soros específicos.

## REFERÊNCIAS

1. Gurtler RE, Cohen JE, Cecere MC, Chuit R. Shifting host choices of the vector of chagas disease *Triatoma infestans* in relation to the availability of hosts in houses in north-west Argentina. *J Appl Ecol.* 1997; 34: 699-715.
2. Rojas A, Vinhaes M, Rodríguez M, Monroy J, Persaud N, Aznar C. et al. Reunião Internacional sobre Vigilância e Prevenção da Doença de Chagas na Amazônia. Implementação da iniciativa intergovernamental de vigilância e prevenção da doença de Chagas na Amazônia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38: 82-9.
3. Crisante G, Rojas A, Teixeira MMG, Anez N. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Trop.* 2006; 98: 247-54.
4. Rowland EC, Chen Z. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* egress from infected fibroblasts is mediated by CD4+ and  $\mu$ + immune cells. *J Parasitol* 2003; 4: 733-7.
5. Lana M, Chiari E, Tafuri WL. Experimental chagas' disease in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87: 59-71.
6. Guedes PMM, Veloso VM, Caliari MV, Carneiro CM, Souza SM, Lana M. et al. *Trypanosoma cruzi* high infectivity in vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in *Beagle* dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 149-7.
7. Andrade ZA, Andrade SG. A patologia da doença de chagas experimental no cão. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1980; 75: 77-95.
8. Troncarelli MZ, Machado JG, Camargo LB, Hoffmann JL, Camossi L, Greca H. et al. Associação entre resultados sorológicos no diagnóstico da leishmaniose e da tripanossomíase canina, pela técnica de imunofluorescência indireta. *Vet Zootec.* 2008; 15: 40-7.
9. Reis GA, Lopes MF. In: \_\_\_\_\_. *Trypanosoma cruzi* e doença de chagas. 2ªed. 2000. p.153-69.
10. Machado EMM, Fernandes AJ, Murta SME, Vitor RWA, Camilo Júnior DJ, Pinheiro SW. ET AL. A study of experimental reinfection by *trypanosoma cruzi* in dogs. *AM J Trop med hyg* 2001; 65: 958-65.

**Recebido em: 13/08/2009**

**Aceito em: 27/05/2009**