

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ISOTÍPICO DAS IMUNOGLOBULINAS G DE INDIVÍDUOS CHAGÁSICOS ANTE OS ANTÍGENOS RECOMBINANTES CRA E FRA DE *Trypanosoma cruzi*¹

Alinne Fernanda Amaral Verçosa

Estudos que visem à melhoria da qualidade de vida dos portadores da enfermidade de Chagas se justificam em virtude da magnitude da infecção, já que aproximadamente 18 milhões de pessoas estão infectadas na América Latina, e de sua elevada morbimortalidade, especialmente por cardiopatia, além da quase ineficácia do tratamento etiológico. Sabe-se que a resposta de isotipos específicos tem sido associada às manifestações clínicas da doença de Chagas. Assim, nos propusemos a pesquisar as subclasses de IgG no soro de indivíduos chagásicos ante dois antígenos específicos do *Trypanosoma cruzi*, visando à obtenção de um perfil isotípico que fosse capaz de discriminar as formas clínicas: cardíaca (CARD), mista (MIS) e indeterminada (IND). Para isso, coletamos sangue para obtenção de soro de 60 pacientes chagásicos (CARD = 33, MIS = 7 e IND = 20), selecionados nos Ambulatórios de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas e do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, ambos situados na cidade de Recife-PE. Todos os pacientes foram avaliados clinicamente para caracterização das formas clínicas e realizaram exames confirmatórios para infecção pelo *T. cruzi*. Além disso, também coletamos sangue de 40 indivíduos sadios (indivíduos não-chagásicos = 20 e controles negativos para o *cut-off* = 20) que apresentaram sorologia negativa para infecção pelo *T. cruzi*. Todos os indivíduos tiveram participação voluntária e os procedimentos adotados no trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Os antígenos recombinantes (Ags-Recs) *Cytoplasmic Repetitive Antigen* (CRA) e *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA) foram analisados através de SDS-PAGE, seguido por colorações com prata e com ácido periódico de *Schiff*, ficando comprovadas a integridade dos Ags-Recs e a ausência de contaminações bacterianas. As concentrações ideais dos Ags-Recs e dos anti-isotipos foram estabelecidas após sua titulação. Para a detecção dos isotipos, utilizamos a metodologia do ELISA indireto cujas placas foram sensibilizadas com os Ags-Recs CRA ou FRA. As amostras de soro foram depositadas em duplicata nos poços. A ligação dos anticorpos específicos foi detectada pela incubação dos antiisotipos (anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4) conjugados à biotina,

1 Resumo de dissertação apresentada ao Departamento de Saúde Coletiva-NESC do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM/FIOCRUZ, sob a orientação da Prof^ª. Dra. Yara de Miranda Gomes e do Prof. Dr. Wayner Vieira de Souza do CPqAM/FIOCRUZ, para obtenção do Título de Mestre em Saúde Pública. Recife, PE, Brasil, 2006.

Endereço para correspondência: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Departamento de Imunologia, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420, Recife-PE.

seguida da incubação de estreptavidina conjugada à peroxidase. A quantificação da reação foi determinada pelo leitor de ELISA a 490 nm. Os resultados foram analisados através de um índice de reatividade no qual as densidades ópticas das amostras foram divididas pelo *cut-off* (média dos controles negativos adicionada de dois desvios-padrão) de suas respectivas placas. Verificamos que a resposta imune humoral gerada pelos pacientes ante os Ags-Recs é bastante variada, com produção de quase todas as subclasses de IgG. Entretanto, apenas o isotipo IgG2 específico contra o Ag-Rec FRA foi capaz de diferenciar os pacientes chagásicos portadores da forma CARD daqueles portadores da forma IND, podendo, após um estudo prospectivo, servir como marcador de evolução clínica para a forma cardíaca. Essa informação é importante, uma vez que permite ao médico avaliar a possibilidade de redirecionar a conduta do tratamento de seu paciente.

CHARACTERIZATION OF ISOTYPE PROFILE OF IMMUNOGLOBULINS G FROM CHAGASIC INDIVIDUALS AGAINST CRA AND FRA RECOMBINANT ANTIGENS OF *Trypanosoma cruzi*

Chagas' disease is an important public health disorder in Latin America, where 18 million people are estimated to be infected. The wide range of clinical manifestations, of which heart involvement is the most significant, because of its characteristics, frequency and consequences, and lack of treatment and cure, justify research in this area. The specific immunoglobulin G (IgG) antibody subclass has been associated with human Chagas' disease. Thus, in this study, the profile of IgG subclasses against two *T. cruzi* specific antigens was correlated with different clinical manifestations of Chagas' disease. At two hospitals located in Recife in the State of Pernambuco, Brazil, we selected 60 patients with Chagas' disease, of whom 33 exhibited cardiac (CARD) manifestations, seven had both cardiac and digestive manifestations and 20 had asymptomatic *T. cruzi* infection (IND). All patients were asked about their clinical status and whether they had received a positive diagnosis for Chagas' disease. We also selected 40 healthy individuals who had been tested negative in serological tests for Chagas' disease (20 non-chagasic and 20 negative controls to calculate the cut-off). The inclusion of all subjects in our investigation had the approval of the Ethics Committees of the Aggeu Magalhaes Research Center. The recombinant antigens (Ags-Recs) *Cytoplasmic Repetitive Antigen* (CRA) and *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA) were analysed using SDS-PAGE, followed by a specific stain with silver and Schiff reagent confirming their integrity and lack of bacterial contamination. The optimal concentration of Ags-Recs and anti-isotypes was established by titration. In order to detect the isotypes, wells of polystyrene microtiter plate were coated with CRA or FRA. Serum samples were added in duplicate to each well and specific binding was detected using biotinylated anti-isotypes (anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 and anti-IgG4) followed by streptavidin-horseradish peroxidase incubation. Optical density was determined (490nm) using

an automated ELISA reader. Our results were analysed using a reactivity index, where the optical density of samples was divided by respective cut-off (negative control average plus two standard-deviations) of each plate. IgG subclasses were detected in almost all Chagas patients studied. Nevertheless, only specific IgG2 isotype FRA was found with a significant statistical difference in CARD patients when compared to IND patients. This result suggests the potential use of this isotype for prognostic purposes, for monitoring the progression of chronic Chagas' disease, and for predicting the risk of CARD damage. However, a follow-up study is necessary to confirm this result. This is important information, as it could help physicians to evaluate and manage the treatment of their patients.