

# NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINAS EM RATOS INFECTADOS POR *Trypanosoma evansi*

LUCAS TREVISAN GRESSLER,<sup>1</sup> ALEKSANDRO SCHAFFER DA SILVA,<sup>2</sup> MATEUS ANDERSON OTTO,<sup>3</sup> MARIA ISABEL AZEVEDO,<sup>3</sup> RÉGIS ADRIEL ZANETTE,<sup>4</sup> SILVIA GONZALEZ MONTEIRO<sup>5</sup> E JANIO MORAIS SANTURIO<sup>6</sup>

1. Graduando em Medicina Veterinária UFSM, bolsista de iniciação científica.

2. Doutorando em Medicina Veterinária UFSM

3. Graduando em Medicina Veterinária UFSM

4. Mestrando em Ciências Veterinárias, UFRGS

5. Professora adjunto UFSM. E-mail: sgmonteiro@uol.com.br

6. Professor associado da UFSM.

## RESUMO

Objetivou-se avaliar os níveis de imunoglobulinas presentes em ratos infectados experimentalmente por *Trypanosoma evansi*. Para isso, inocularam-se vinte animais com 10<sup>6</sup> tripomastigotas de *T. evansi* e dez ratos usados como controle. Controlou-se a parasitemia através de esfregaço sanguíneo diário, sendo que no quinto dia após a inoculação os animais foram divididos em três grupos homogêneos. Formaram-se os grupos A e B por ratos que apresentaram elevada e baixa parasitemia, respectivamente,

e o grupo C por ratos sadios. Submeteram-se as amostras de soro ao teste de ELISA para quantificação de imunoglobulinas. A IgG e IgM de ratos dos grupos A e B foram superiores aos do grupo C. Já a IgM de ambos os grupos infectados não diferiu, apesar do grau de parasitemia. Portanto, os ratos infectados por *T. evansi* apresentaram resposta imunológica frente à infecção pelo flagelado, embora esta não seja suficiente para eliminar o protozoário na infecção aguda.

PALAVRAS-CHAVES: IgG, IgM, *Ratus norvegicus*, *Trypanosoma evansi*.

## ABSTRACT

### IMMUNOGLOBULIN LEVELS IN *Trypanosoma evansi* INFECTED RATS

This study aimed at evaluating the immunoglobulin levels in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. Twenty animals were inoculated with 10<sup>6</sup> trypomastigote forms and ten rats were used as control. Parasitemia was monitored by examining daily blood smears. Rats were separated into three equal groups in the fifth day PI: groups A and B were formed by rats with low and moderate

parasitemia, respectively; group C was formed by non-infected rats. IgG and IgM were evaluated by ELISA test and were superior when compared to group C. The IgM levels did not differ between the infected groups. It may be concluded that the infected rats showed an immunological response against *T. evansi*, although this was not enough to eliminate the parasite in acute infection.

KEY WORDS: IgG, IgM, *Ratus norvegicus*, *Trypanosoma evansi*.

## INTRODUÇÃO

*Trypanosoma evansi* é um protozoário flagelado causador da doença conhecida como mal das cadeiras

ou surra em equinos. No Brasil, regiões endêmicas como o pantanal mato-grossense e áreas de clima tropical têm registro de parasitismo em várias espécies animais como cavalos, bovinos, caprinos, suínos, cães,

capivaras, quatis, antas, veados e pequenos roedores silvestres. Além disso, a doença está se expandindo para o restante do país (SILVA et al., 2002; ZANETTE et al., 2008). A transmissão desse parasito ocorre por vetores, sendo os insetos hematófagos os principais responsáveis (*Tabanus* sp., *Chrysops* sp. e *Hematopota* sp.) (SILVA et al., 2002).

Em coelhos infectados por *T. evansi*, observou-se variação entre animais na manifestação clínica e imunológica da doença, sendo que a parasitemia e os sinais clínicos da doença não ocorrem em todos os animais infectados (UCHE et al., 1992; DA SILVA et al., 2008a). Pesquisadores mencionam a elevação das imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) como as responsáveis pela resistência dessa espécie ao protozoário (UCHE et al., 1992).

Coelhos possuem anticorpos contra o *T. evansi* adquiridos a partir de uma infecção de evolução crônica (UCHE et al., 1992). Ao contrário, ratos apresentam infecção aguda pelo flagelado, com morte em até sete dias (DOYLE et al., 2007; DA SILVA et al., 2008b). Baseado na hipótese de que a mortalidade dos ratos ocorre antes mesmo da formação de imunoglobulinas, este estudo teve a finalidade de avaliar a resposta imunológica dos ratos diante da infecção aguda por *T. evansi*. Em virtude disso, a pesquisa teve o objetivo de quantificar os níveis de IgG e IgM presentes na circulação de ratos infectados experimentalmente pelo protozoário.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se trinta ratos (*Rattus norvegicus*), adultos, machos, dos quais vinte foram inoculados com  $10^6$  tripomastigotas de *T. evansi* pela via intraperitoneal e o restante utilizado como controle. O isolado do parasito utilizado foi oriundo de um cão infectado naturalmente (COLPO et al., 2005), criopreservado em nitrogênio líquido. Controlou-se a parasitemia dos ratos por meio de esfregaços sanguíneos diários (DA SILVA et al., 2006). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (23°C) e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

Cinco dias após a inoculação, dividiram-se igualmente os animais em três grupos de dez ratos cada. O grupo A foi formado por ratos que apresentaram parasitemia crescente pelo protozoário, isto é, apresen-

tavam mais de cinquenta tripomastigotas por campo em aumento de 1.000 vezes. Compôs-se o grupo B por roedores com parasitemia entre zero e cinco parasitas por campo em aumento de 1.000 vezes. Formou-se o grupo C por animais sadios, que não foram infectados com o *T. evansi*. Procedeu-se à quantificação de protozoários por mililitro de sangue em câmara de Neubauer. O estudo visou avaliar se esses diferentes graus de parasitemia estavam relacionados com os níveis de imunoglobulinas e se no quinto dia após infecção já seria possível detectar IgG.

No quinto dia de pesquisa, todos os animais foram anestesiados com éter etílico para coleta de sangue intracardiaco e posterior eutanásia. Da amostra de sangue, separou-se o soro, sendo este armazenado à temperatura de -20°C até sua análise. O material foi submetido ao teste de ELISA comercial<sup>1</sup> (Rat IgG ELISA Quantitation Set<sup>®</sup> e Rat IgM ELISA Quantitation Set<sup>®</sup>), conforme orientação do fabricante, para quantificação dos níveis de IgG e IgM nos diferentes grupos. Processaram-se os soros na diluição de 1:3600 e compararam-se os resultados com a curva obtida no calibrador ( $R^2 > 0,93$ ). Cada amostra foi realizada em triplicata.

Analisaram-se estatisticamente níveis de imunoglobulinas por meio análise de variância (ANOVA), para avaliação das diferenças entre grupos, seguida por aplicação do teste de Tukey, para comparação entre médias (SILVA & AZEVEDO, 2002). O presente experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), nº23081.003854/2008-56, de acordo com legislação vigente e os princípios éticos publicados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

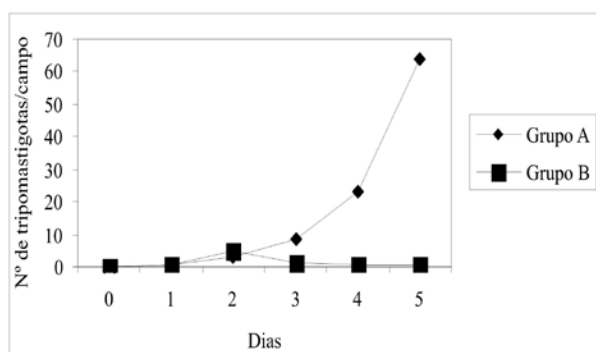
## RESULTADOS

Os animais dos grupos A e B apresentaram período pré-patente entre 24 e 48 horas, sendo que o grupo A demonstrou uma parasitemia progressiva, superior a cinquenta parasitas por campo de microscopia óptica no quinto dia após a infecção. Os animais do grupo B apresentaram parasitemia com picos irregulares, oscilando entre zero e cinco flagelados (Figura

1. Rat IgG ELISA Quantitation Set<sup>®</sup> e Rat IgM ELISA Quantitation Set<sup>®</sup> - Bethyl Laboratories INS. Montgomery - USA.

1). A contagem de flagelados em câmara de Neubauer quantificou  $10^8$  e  $10^5$  tripomastigotas por mililitro de sangue nos grupos A e B, respectivamente.

Imunologicamente, houve diferença estatística significativa entre os animais infectados (grupos A e B) e controle (grupo C), tanto para IgG quanto para IgM ( $p < 0,05$ ). As duas imunoglobulinas aumentaram consideravelmente nos animais parasitados (Tabela 1). Em ambos os grupos inoculados, os níveis de IgM foram semelhantes, mas superiores ao controle. Já IgG diferiu em todos os grupos, sendo mais elevada no grupo A (Tabela 1).



**FIGURA 1.** Evolução da parasitemia por *Trypanosoma evansi* em ratos infectados experimentalmente (grupo A e B). A quantificação de tripomastigotas foi realizada de acordo com DA SILVA et al. (2006).

**TABELA 1.** Média e desvio-padrão de imunoglobulinas M e G de ratos após cinco dias da infecção por *Trypanosoma evansi*

Grupos	Parasitemia ( <i>T. evansi</i> /campo)	IgG ( $\times 10^1$ ng/ml)	IgM ( $\times 10^1$ ng/ml)
A	65 <sup>a</sup> ( $\pm 12,8$ )	105 <sup>a</sup> ( $\pm 8,5$ )	70 <sup>a</sup> ( $\pm 10,7$ )
B	03 <sup>b</sup> ( $\pm 1,4$ )	56,6 <sup>b</sup> ( $\pm 8,8$ )	68,4 <sup>a</sup> ( $\pm 5,5$ )
C	00 <sup>c</sup> ( $\pm 0,0$ )	17,8 <sup>c</sup> ( $\pm 3,9$ )	11,9 <sup>b</sup> ( $\pm 4,1$ )

Obs.: Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si em nível de significância de 5% no teste de Tukey.

## DISCUSSÃO

O período pré-patente, compreendido desde a inoculação do parasito até o aparecimento na circulação, observado neste estudo foi semelhante a outras pesquisas já realizadas com este isolado (DOYLE et

al., 2007; DA SILVA et al., 2008b). Já a multiplicação do flagelado não foi a mesma em todos os animais, possibilitando formar dois grupos distintos baseado no número de parasitos na circulação. Conforme a literatura, essa diferença entre os ratos na evolução da parasitemia pode estar relacionada à patogenicidade da cepa ou à resposta imunológica do hospedeiro diante da infecção (QUEIROZ et al., 2000; CARMONA et al., 2006; OMER et al., 2007).

Os níveis de IgG e IgM dos ratos do grupo A e B foram superiores aos do grupo C. Em cães e ratos, pesquisadores também observaram altos títulos de anticorpos de IgG e IgM em animais com parasitemia constante ou elevada (AQUINO et al., 1999; QUEIROZ et al., 2001). Esse aumento de imunoglobulinas é sugerido pelos autores como uma resposta humoral relacionada a ambas as imunoglobulinas, porém são insuficientes no controle da população do parasita (QUEIROZ et al., 2001).

É sabido que ensaios imunoenzimáticos são eficientes para detecção da IgG em animais infectados. Portanto, níveis elevados dessa imunoglobulina em animais suspeitos para *T. evansi* podem ser uma ferramenta de diagnóstico (OIE, 2008). Levando em consideração os dados obtidos neste estudo, conclui-se que a IgG eleva-se de acordo com o número de parasitos presentes na corrente sanguínea (Tabela 1). A hipótese era de que IgG não estaria aumentada no quinto dia após infecção, pois seria um período insuficiente de exposição do agente, conforme a literatura (QUEIROZ et al., 2001; OIE, 2008), o que foi observado. Estimava-se que os animais morriam em até sete dias após inoculação (DOYLE et al., 2007), devido à ausência de IgG, imunoglobulina esta com ação tripanocida (OIE, 2008), neste período de cinco dias.

Neste experimento, os níveis de IgM não diferiram entre os grupos infectados, mostrando que se trata de imunoglobulina que responde à infecção por *T. evansi*, independente do grau de parasitemia. Segundo pesquisadores, esse flagelado apresenta um perfil de interação hospedeiro-parasito, que, quando associados, induzem moléculas pró-inflamatórias. No entanto, apenas IgM contribuem significativamente para o controle do *T. evansi* (BARAL et al., 2007).

## CONCLUSÕES

A infecção por *T. evansi* induz a resposta do hospedeiro, elevando os níveis séricos de IgG e IgM. O grau de parasitemia não influencia a concentração sérica de IgM. Após cinco dias de infecção, já é possível quantificar IgG em ratos com *T. evansi* e a concentração está diretamente proporcional ao grau de parasitemia. O aumento de imunoglobulinas é insuficiente para controlar a multiplicação do parasito.

## REFERÊNCIAS

- AQUINO, T. L. P. C.; MACHADO, R. Z.; ALESSI, A. C.; MARQUES, L. C.; CASTRO, M. B.; MALHEIROS, E. B. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 255-260, 1999.
- BARAL, T. N.; BAETSELIER, P.; BROMBACHER, F.; MAGEZ, S. Control of *Trypanosoma evansi* infection is IgM mediated and does not require a type inflammatory response. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 10, p. 1513-1520, 2007.
- CARMONA, T.M.P.; GARRIZZO, J.; ROSCHMAN-GONZÁLEZ, A. Susceptibility of different mouse strains to experimental infection with a Venezuelan isolate of *Trypanosoma evansi*. **Journal of Protozoology Research**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2006.
- COLPO, C. B.; COLPO, E. T. B.; STAINKI, D. R.; MONTEIRO, S. G. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cão no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 717-719, 2005.
- DA SILVA, A. S.; COSTA, M. M.; DOYLE, R. L.; LOPES, S. T. A.; MONTEIRO, S. G. Infecção experimental por *Trypanosoma evansi* em coelhos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 519-523, 2008a.
- DA SILVA, A. S.; TOCHETTO, C.; ZANETTE, R. A.; PIEREZAN, F.; RISSI, D. R.; SANTURIO, J. M.; MONTEIRO, S. G. Aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb no controle de infecção por *Trypanosoma evansi* em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1357-1362, 2008b.
- DA SILVA, A. S.; DOYLE, R. L.; MONTEIRO, S. G. Método de contenção e confecção de esfregaço sanguíneo para pesquisa de hemoparasitas em ratos e camundongos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 13, n. 2, p. 83-87, 2006.
- DOYLE, R. L.; DA SILVA, A. S.; MONTEIRO, S. G.; SANTURIO, J. M.; GRAÇA, D. L. Eficácia de medicamentos no controle da infecção experimental por *Trypanosoma evansi* em ratos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 1, p. 67-71, 2007.
- OIE Terrestrial Manual. *Trypanosoma evansi* infections (including surra). In: **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. 2<sup>nd</sup>. Paris: Terrestrial Manual, 2008. p. 351-360.
- OMER, O. H.; MOUSA H. M.; AL-WABEL, N. Study on the antioxidant status of rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 1-2, p. 142-145, 2007.
- QUEIROZ, A. O.; CABELLO, P. H.; JANSEN, A. M. Biological and biochemical characterization of isolates of *Trypanosoma evansi* from Pantanal of Matogrosso. **Veterinary Parasitology**, v. 92, n. 2, p. 107-118, 2000.
- QUEIROZ, A. O.; LEGEY, A. P.; XAVIER, S. C. C.; JANSEN, A. M. Specific antibody levels and antigen recognition of wistar rats inoculated with distinct isolates of *Trypanosoma evansi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 965-967, 2001.
- SILVA, F. A. Z.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.
- SILVA, R. A. M. S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. **Metodologia da criopreservação dos *Trypanosomas evansi* e *Trypanosoma vivax***. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. 137 p.
- UCHE, U. E.; JONES, T. W.; BOID, R. Antibody patterns in rabbits showing different levels of susceptibility to an experimental *Trypanosoma evansi* infection. **Acta Tropica**, v. 52, n. 2-3, p. 139-147, 1992.
- ZANETTE, R. A.; DA SILVA, A. S.; COSTA, M. M.; MONTEIRO, S. G.; SANTURIO, J. M.; LOPES, S. T. A. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em equinos no município de Cruz Alta, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1468-1471, 2008.

Protocolado em: 23 jan. 2009. Aceito em: 20 set. 2009.