

Avaliação hematológica e histopatológica de camundongos BALB/c e C57BL/6 expostos aos antígenos recombinantes *Cytoplasmic Repetitive Antigen* e *Flagellar Repetitive Antigen* de *Trypanosoma cruzi*

Hematological and histopathological evaluation of BALB/c and C57BL/6 mice exposed to *Cytoplasmic Repetitive Antigen* and *Flagellar Repetitive Antigen* recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*

Valéria Rêgo Alves Pereira¹, Virginia Maria Barros de Lorena¹, Ana Paula Galvão-da Silva², Mineo Nakazawa¹, Edimilson Domingos da Silva³, Antonio Gomes Pinto Ferreira³, Ulisses Montarroyos¹, Eridan de Medeiros Coutinho¹ e Yara de Miranda Gomes¹

Resumo Os antígenos recombinantes *Cytoplasmic Repetitive Antigen* e *Flagellar Repetitive Antigen* de *Trypanosoma cruzi* foram inoculados em camundongos BALB/c e C57BL/6 e o seu efeito avaliado a nível hematológico e histopatológico. Os resultados mostraram que o padrão histológico normal dos órgãos e o perfil hematológico dos camundongos não foram modificados sugerindo que esses antígenos não parecem causar dano ao animal.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*. Antígenos recombinantes. Perfis hematológico e histopatológico.

Abstract The *Cytoplasmic Repetitive Antigen* and *Flagellar Repetitive Antigen* recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* were inoculated into BALB/c and C57BL/6 mice and its effects evaluated at hematological and histopathological levels. The results showed that the histological pattern of the organs and the hematological profile of mice were not modified suggesting that these antigens are not harmful for the animal.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*. Recombinant antigens. Hematological and histological profiles.

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é circunscrita à América Latina, onde estima-se que a prevalência da infecção humana, em 21 países, é de cerca de 16 milhões de casos e que aproximadamente 100 milhões de indivíduos (25% de todos os habitantes da América Latina), estão sob o risco da infecção¹⁸.

Não existe, até o momento, quimioterapia segura disponível para o tratamento da doença, responsável por alta morbidade nos indivíduos infectados que apresentam a forma crônica determinada. Os tradicionais antiparasitários nifurtimox e benzonidazol são parcialmente eficazes, atuando apenas na fase aguda da infecção² e seu potencial de cura parasitológica

é dependente do tipo de cepa albergada pelo hospedeiro¹. A maioria dos indivíduos na fase crônica da infecção é resistente ao tratamento com a quimioterapia convencional, mantendo a infecção por toda a vida. Indivíduos que não desenvolvem sintomas representam uma ameaça como doadores de sangue, podendo transmitir a doença por transfusão sanguínea. Segundo Costa et al⁴, o desenvolvimento de intervenções imunes, tais como imunização, podem ser de utilidade para aumentar a eficácia do tratamento em pacientes que não respondem à quimioterapia convencional.

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, vários genes que codificam proteínas antigênicas de *T. cruzi* têm sido clonados. Os

1. Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE. 2. Departamento de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE. 3. Laboratório de Reativos, Bio-Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

Suporte financeiro: Bio-Manguinhos/FIOCRUZ (CC 04/2002) e CNPq.

Endereço para correspondência: Dra. Yara M Gomes. Dept^o de Imunologia/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE.

e-mail: yara@cpqam.fiocruz.br

Recebido para publicação em 3/4/2003

Aceito em 1/9/2003

segmentos dos genes clonados têm sido usados para produzir porções das proteínas antigênicas em bactérias, e várias destas, isoladas ou associadas, têm sido usadas como antígenos alvos em ensaios de sorodiagnóstico^{9 15} ou em estudos de imunoproteção^{12 13 14}.

Dois antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi*, *Cytoplasmic Repetitive Antigen* (CRA) e *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA), produzido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Brasil, têm sido usados com sucesso no diagnóstico da doença de Chagas^{6 7 9 17}. Visando a utilização desses antígenos em posteriores ensaios de vacinação, investigamos no presente trabalho o seu efeito em camundongos BALB/c e C57BL/6 não infectados, analisando os perfis hematológico e histopatológico. CRA possui elementos de repetição de 14 aminoácidos e é detectado nas formas epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, enquanto FRA possui elementos de repetição de 68 aminoácidos e é encontrado nas formas epimastigotas e tripomastigotas¹⁰.

Camundongos BALB/c e C57BL/6 machos (6 - 8 semanas de idade), provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil foram usados no presente trabalho. O protocolo utilizado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA da FIOCRUZ (P0082-01).

As proteínas recombinantes CRA e FRA foram obtidas como previamente descrito por Kireger et al⁹ e sua pureza verificada através da coloração pela prata segundo Morrisey¹¹.

Dois grupos (G1 e G2) de cada linhagem de camundongos avaliada (BALB/c e C57BL/6) receberam 3 injeções por via subcutânea de 20µg e 12µg dos antígenos CRA e FRA, respectivamente, em intervalos de 20 dias. A primeira injeção foi efetuada com o

adjuvante completo de Freund (100µl) e as seguintes com adjuvante incompleto. Camundongos controles foram injetados com PBS (pH 7,2) e com os adjuvantes. Trinta dias após a última imunização foram avaliados os perfis hematológico e histopatológico dos animais.

A contagem global de células foi efetuada pelo aparelho Coulter – Modelo STKS. A contagem específica de leucócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo em lâminas coradas pelo Giemsa, avaliando-se um total de 100 células³. O sangue foi coletado por punção do plexo orbital.

Para a análise estatística dos dados obtidos, testes não paramétricos que incluíram os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados, considerando-se significativo $p < 0,05$.

Camundongos imunizados e controles foram sacrificados após deslocamento cervical, 4 semanas após a última injeção e submetidos a necropsia completa. Fragmentos de fígado, baço e coração foram fixados em formol neutro a 10% seguindo-se a inclusão em parafina. A análise histológica foi procedida em cortes de 5µm, corados pela hematoxilina-eosina.

O perfil hematológico dos camundongos que receberam essas proteínas por via subcutânea não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle, tanto em relação ao eritrograma (hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio-VCM, hemoglobina corpuscular média-HCM, concentração de hemoglobina corpuscular média-CHCM e distribuição volumétrica dos eritrócitos-RDW) (Tabela 1) quanto ao leucograma (leucometria) (Tabela 2). A análise histopatológica dos órgãos selecionados, provenientes de camundongos dos G1 e G2 revelou estruturas de aspecto normal e ausência de reações inflamatórias e lesões degenerativas, necrotizantes, proliferativas ou de qualquer outra natureza, como o grupo controle.

Tabela 1 - Leucograma de camundongos BALB/c e C57 BL/6 30 dias após 3ª imunização.

Parâmetros hematológicos	BALB/c			C57 BL/6		
	CRA	FRA	controle	CRA	FRA	controle
Leucograma						
leucócitos (10 ³ /µl)	4,8 ± 0,9	5,6 ± 2,6	6,5 ± 2,2	14,9 ± 4,4	15,3 ± 2,3	15,5 ± 4,1
neutrófilo (10 ³ /µl)	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,5	0,9 ± 0,4	0,6 ± 0,1	0,95 ± 0,8
linfócito (10 ³ /µl)	4,1 ± 1,1	4,9 ± 2,3	5,5 ± 2,0	11,9 ± 5,1	14,6 ± 2,4	14,25 ± 3,8
monócito (10 ³ /µl)	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
eosinófilo (10 ³ /µl)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,03 ± 0,05	0,03 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
basófilo (10 ³ /µl)	0,1 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1

Os resultados se referem a média ± desvio padrão. CRA - camundongos imunizados com antígeno recombinante CRA; FRA - camundongos imunizados com antígeno recombinante FRA.

Estes resultados são importantes porque demonstram que os antígenos CRA e FRA não alteram o padrão histológico normal dos órgãos dos animais, nem os parâmetros hematológicos avaliados, estes últimos considerados como um dos melhores métodos para monitorar alterações que possam interferir em

variáveis experimentais. A ausência de modificações no leucograma, sobretudo, na contagem de linfócitos, constitui um achado importante, visto que nos fornece subsídios para posteriores ensaios de vacinação, uma vez que os linfócitos são as principais células responsáveis pela indução da imunidade protetora.

Tabela 2 - Eritrograma de camundongos BALB/c e C57 BL/6 30 dias após 3ª imunização.

Parâmetros hematológicos*	BALB/c			C57BL/6		
	CRA	FRA	controle	CRA	FRA	controle
Eritrograma						
eritrócitos (10 ⁶ /μl)	9,5 ± 0,1	9,4 ± 0,8	9,3 ± 0,4	8,5 ± 0,5	8,7 ± 0,4	8,76 ± 0,2
hemoglobina g/dl	15,8 ± 0,3	16,2 ± 0,6	15,2 ± 1,2	14,5 ± 1,0	14,9 ± 0,4	15,2 ± 0,3
hematócrito (%)	44,8 ± 0,8	45,9 ± 4,3	43,6 ± 2,4	40,1 ± 2,4	40,0 ± 1,6	41,6 ± 1,8
VCM (fl)	47,2 ± 0,5	47,6 ± 0,6	47,1 ± 1,5	47,1 ± 0,3	46,2 ± 0,7	47,4 ± 1,1
HCM (pg)	16,7 ± 0,35	16,9 ± 1,1	16,4 ± 1,4	17,0 ± 0,5	17,3 ± 0,5	17,35 ± 0,2
CHCM (g/dl)	35,4 ± 0,8	35,4 ± 2,8	34,8 ± 2,0	36,1 ± 1,2	37,5 ± 0,5	36,6 ± 1,3
RDW (%)	40,4 ± 0,6	38,2 ± 1,5	39,2 ± 1,0	35,1 ± 1,1	38,3 ± 1,2	32,1 ± 8,5

VCM=volume corpuscular médio, HCM=hemoglobina corpuscular média, CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média, RDW=distribuição volumétrica dos eritrócitos.

Os resultados se referem a média ± desvio padrão. CRA - camundongos imunizados com antígeno recombinante CRA; FRA - camundongos imunizados com antígeno recombinante FRA.

Embora os níveis de linfócitos circulantes estivessem dentro dos valores normais, resultados obtidos em nosso laboratório mostram um aumento seletivo do número de linfócitos T CD4⁺ no baço de animais imunizados (Pereira et al., manuscrito em preparação), sugerindo que estes antígenos são imunogênicos.

Embora os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi* sejam reconhecidos apenas pelo soro de indivíduos chagásicos e tenham sido usados com sucesso no diagnóstico da doença de Chagas^{6,7,9}, nenhum estudo foi realizado envolvendo a avaliação do efeito dessas substâncias em animais. Proteínas

que contêm estruturas de repetição, como os antígenos CRA e FRA, localizadas ou associadas à superfície do parasita ou secretadas por ele próprio, são fortemente imunogênicas⁸. Além disso, antígenos com uma estrutura de repetição parecem desempenhar um papel na interação entre o parasita e o sistema imune do hospedeiro^{5,14}.

Estudos sobre a caracterização das propriedades imunogênicas desses antígenos em camundongos infectados com *T. cruzi* estão em curso, com a finalidade de verificar as respostas imunes celular e humoral em camundongos de diferentes linhagens.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Frederico G.C. Abath pela revisão crítica do presente manuscrito, a Roni Evêncio Araújo pelo excelente apoio técnico nas preparações histológicas e a Bio-Manguinhos/FIOCRUZ (CC 04/2002) pelo suporte financeiro. Valéria RA Pereira e Virginia Maria B Lorena detêm bolsa de Doutorado e Iniciação Científica do CNPq, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL. Evaluation of chemotherapy with benzimidazole and nifurtimox, in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. Bulletin of the World Health Organization 63:721-726, 1985.
- Cançado JR. Tratamento específico. In: Chuster M (ed) *Cardiopatia Chagásica*: Fundação Carlos Chagas, Belo Horizonte, 1985.
- Cardoso CVP, Marques MAP, Araújo-Jorge TC, Castro SL, Rivera MT. In: *Doença de Chagas. Manual para experimentação animal*. Araújo-Jorge T, Castro SL (orgs) Editora Fundação Oswaldo Cruz, Cap 12, p. 203-208, 2000.
- Costa F, Franchin G, Pereira-Chiocola VL, Ribeirão M, Schenkman S, Rodrigues MM. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Vaccine 16:768-774, 1998.
- Frasch ACC, Cazzullo JJ, Aslund L, Petterson U. Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. Parasitology Today 7:148-151, 1991.
- Goldenberg S, Krieger MA, Lafaille JJ, Almeida E, Oelemann W. Use of *Trypanosoma cruzi* antigens in the immunological diagnosis of Chagas' disease. Memórias do Instituto Butantan 53:71-76, 1991.
- Gomes YM, Pereira VRA, Nakazawa M, Rosa DS, Ferreira AGP, Silva ED, Krieger M, Goldenberg S. Serodiagnosis of chronic Chagas' disease by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 96:497-501, 2001.
- Ibañez CF, Afranchino JL, Macina RA, Reyes MB, Leguizamon S, Camargo ME, Aslund L, Petersson U, Frasch ACC. Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing randomly/tandemly repeated amino acid sequence motifs. Molecular Biochemical Parasitology 30:27-34, 1988.
- Krigger MA, Almeida E, Oelemann W, Lafaille JJ, Pereira JB, Krieger MA, Carvalho MR, Goldenberg S. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 46:427-434, 1992.
- Lafaille JJ, Linss J, Krieger MA, Souto-Padron T, de Souza W, Goldenberg S. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive

- epitopes. *Molecular Biochemical Parasitology* 35:127-136, 1989.
11. Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry* 117:307-10, 1981.
 12. Pereira-Chiocola VL, Costa F, Ribeiro M, Soares IS, Arena F, Schenkman S, Rodrigues MM. Comparison of antibody and protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein. *Parasite Immunology* 21:103-110, 1989.
 13. Santori FR, Paranhos-Bacalla GS, Silveira JF, Yamauchi LM, Araya JE, Yoshida N. A recombinant protein based on the *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote 82-kilodalton antigen that induces an effective immune response to acute infection. *Infection and Immunity* 64:1093-1099, 1996.
 14. Sepulveda P, Hontebeyrie M, Liegeard P, Mascilli A, Norris KA. DNA-based immunization with *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and confers protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* 68:4986-4991, 2000.
 15. Silva ED, Pereira VRA, Gomes JAS, Nakazawa M, Lorena VMB, Caçado JR, Ferreira AGP, Krieger MA, Goldenberg S, Correa-Oliveira R, Gomes YM. Use of EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit to monitor cure of human Chagas' Disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 16:132-136, 2002.
 16. Silveira JF. *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens for serodiagnosis. In: Wendel S, Brener B, Camargo ME, Rasser A (eds) "Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine". International Society of Blood Transfusion p. 207-217, 1992.
 17. Umezawa ES, Bastos S, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, Zingales B, Levin MJ, Sousa O, Rangel-Aldao R, da Silveira JF. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. *Journal of Clinical Microbiology* 37:1554-1560, 1999.
 18. World Health Organization. Control of Tropical disease. Chagas' disease. A disease whose days are numbered, 1996.