

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO E TOXICIDADE DE ANTICORPOS AVIÁRIOS IGY ANTI- *Trypanosoma evansi*

LUZIA CRISTINA LENCIONI SAMPAIO¹; MATHEUS DELLAMÉA BALDISSERA², THIRSSA HELENA GRANDO², LUCAS TREVISAN GRESSLER², DANIEL ROULIM STAINKI²; SILVIA GONZALEZ MONTEIRO³

¹Universidade Federal de Pelotas – sampaio.cris@gmail.com

²Universidade Federal de Santa Maria – matheusd.biomed@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Santa Maria – sgmonteiro@uol.com.br

1. INTRODUÇÃO

Trypanosoma evansi (*T. evansi*) é um protozoário emergente, que infecta a maioria das espécies domésticas, algumas espécies silvestres e o homem. A enfermidade produzida por este parasito adquire grande importância na espécie equina, causando sintomatologia grave e levando os animais a óbito (HOARE, 1972). No Brasil, várias regiões já registraram casos de tripanossomose equina nos últimos anos (NUNES et al., 2011). A situação é preocupante, uma vez que a doença causa sérios prejuízos econômicos, principalmente quando afeta animais de alto valor zootécnico. A queda da produtividade e óbito são consequências da forma aguda da doença. No entanto, a manifestação crônica adquire maior importância, pois além da queda de *performance* ou produtividade do animal, a condição de portador da enfermidade e recidivas do quadro clínico são situações agravantes. Embora existam vários protocolos quimioterápicos relatados na literatura, tanto para profilaxia como para o tratamento da enfermidade diagnosticada, constata-se que até o presente momento ainda não se conseguiu um tratamento realmente eficaz para o controle desse protozoário (SILVA et al., 2004).

A “Tecnologia IgY” baseia-se na imunização de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) e extração de anticorpos IgY-específicos a partir da gema do ovo. O procedimento é aceito internacionalmente como método alternativo a favor do bem estar animal por se tratar de procedimento não invasivo (SCHADE et al., 2005). Atualmente reconhece-se uma série de vantagens ao utilizar anticorpos aviários ao invés de anticorpos de mamíferos.

Nossos estudos tiveram como objetivos a produção e caracterização de anticorpos IgY anti-*T.evansi* a partir de inoculações periódicas com formas tripomastigotas do parasito em galinhas poedeiras, avaliação *in vitro* da cito e

genotoxicidade e avaliação *in vivo* da eficácia profilática e terapêutica dos anticorpos produzidos.

2. METODOLOGIA

Três galinhas poedeiras, raça New Hampshire com 25 semanas de idade, foram imunizadas com formas tripomastigotas de *T. evansi*. A extração da IgY a partir da gema do ovo foi realizada conforme método descrito por POLSON et al. (1980). As imunoglobulinas extraídas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % (SDS-PAGE) sob condições redutoras. A reação antígeno anticorpo foi evidenciada através do Western Blot e ELISA avides. A concentração de IgY específica anti-*T.evansi* extraída foi avaliada pelo método Coomassie Blue usando albumina sérica bovina como padrão.

Testes *in vitro* avaliaram a citotoxicidade (Teste MTT- viabilidade celular) e genotoxicidade (instabilidade cromossomal e índice mitótico). A eficácia terapêutica foi testada em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente com *T. evansi*. Foram avaliadas a ação da IgY-anti *T. evansi* nas doses de 10 e 30 mg.kg⁻¹ isoladamente e associada ao dipropionato de imidocarb e diaceturato de diminazene. Os animais foram observados durante 90 dias para monitoramento da parasitemia.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes *in vitro* utilizando cultura de células de linfócitos humanos permitem avaliar os efeitos sobre a estrutura e fisiologia celular (ROGERO et al., 2003). Ao colocarmos os anticorpos IgY em contato direto com cultura de células de mamíferos, nenhuma alteração anatômica, fisiológica e da viabilidade celular foi constatada, o que os tornam biocompatíveis para uso na biomedicina. Testes de genotoxicidade são importantes para avaliação de danos ao material genético, com conseqüente indução de carcinogênese e impactos na reprodução celular (DOAK et al., 2011). Ao submetemos as imunoglobulinas IgY ao teste de instabilidade cromossômica e índice mitótico, não foram observadas alterações da estrutura do DNA e da reprodução celular.

Nos testes *in vivo*, ao avaliarmos a ação profilática destes anticorpos nas doses de 10 mg.kg⁻¹ e 30 mg.kg⁻¹, observamos que na maior dose o período pré-patente foi superior estatisticamente. Considerando que a vida média da IgY na circulação sanguínea varia entre 36 a 65 horas (WOOLLEY e LANDON, 1995) e que em ambos os tratamentos a IgY foi administrada durante os cinco dias anteriores à infecção, constatamos que a dose de 30 mg.kg⁻¹ manteve níveis plasmáticos suficientes para impedir o desenvolvimento do protozoário logo após infecção, o que ficou evidenciado pelo período pré patente de 14.8 ± 2.1 dias.

Todos os protocolos de tratamento administrados em ratos infectados, diferiram estatisticamente do grupo controle positivo em relação a longevidade. A administração de imunoglobulinas IgY por via intraperitoneal com fins terapêuticos é descrita por ZHEN et al. (2011) e FENG et al. (2013), entretanto não há um consenso em relação a dose e duração do tratamento com estes anticorpos. Em nosso estudo foi administrado IgY aviária nas doses de 10 mg.kg⁻¹ e 30 mg.kg⁻¹, e constatamos que ambas diferiram significativamente do grupo controle. Igualmente, a longevidade do grupo que recebeu a dose de 30 mg.kg⁻¹ foi significativamente superior em relação ao grupo que recebeu a menor dose.

Relatos descrevem a eficácia da imunização passiva com anticorpos IgY com fins profiláticos e terapêuticos (MULVEY et al., 2011; VEGA et al., 2012). Nosso estudo sugere que a profilaxia reforça o sistema imunológico dos animais frente a infecção pelo protozoário e aumenta o período pré-patente; e, a continuidade do tratamento aumenta a longevidade destes animais.

Dipropionato de imidocarb é indicado para profilaxia e tratamento de babesioses em bovinos e equinos. Em nosso estudo, a administração de protocolo semelhante ao descrito por DA SILVA et al. (2008), que obteve 30 dias de longevidade em ratos, não controlou a infecção e os animais vieram a óbito entre o 12^o e 14^o dia. A administração da droga associada ao anticorpo específico aumentou a sobrevivência dos animais, mas houve recidiva a partir do 9^o dia pós infecção e a morte de todos os ratos até o 25^o dia. Neste protocolo, ao testarmos uma droga com pouca eficácia terapêutica contra o *T. evansi*, ficou evidenciado o efeito das imunoglobulinas aviárias sobre a longevidade de animais infectados.

A comparação entre o grupo tratado com diaceturato de diminazene e o grupo tratado com a associação anticorpo-diaceturato de diminazene, não mostrou diferença estatística significativa entre eles. Nossos resultados coincidem aos descritos por DA SILVA et al. (2008) em relação ao controle da infecção e longevidade, e justificam a ausência de diferença estatística entre os grupos. Pode-se afirmar que em ambos os grupos a infecção foi controlada pelo fármaco, não sendo possível avaliar o efeito dos anticorpos IgY.

4. CONCLUSÕES

O protocolo de imunização e extração usados nesta pesquisa permitiu a obtenção de anticorpos específicos contra o protozoário e inócuo para o hospedeiro.

Ao serem submetidas a testes de toxicidade *in vitro*, as imunoglobulinas IgY não mostraram danos em membrana celular de linfócitos humanos, não interferiram na viabilidade celular e não produziram alterações no DNA em nível cromossômico; não apresentando portanto, citotoxicidade e genotoxicidade, nas concentrações testadas.

Nos testes *in vivo*, a administração destes anticorpos, por via intraperitoneal, na dose de 10 mg.kg⁻¹, não apresentou ação profilática e não controlou a infecção, mas aumentou a longevidade quando associada ao tratamento com fármacos anti-hematozoários. A dose de 30 mg.kg⁻¹, administrada profilaticamente e após a infecção experimental, promoveu aumento do período pré patente e longevidade em ratos infectados com *T. evansi*. A associação de anticorpos anti *T. evansi* ao tratamento farmacológico reforçou o sistema imunológico de animais infectados, aumentando a longevidade, desenvolvendo uma melhor resposta terapêutica ao tratamento instituído.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DA SILVA, A. S. et al. Aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb no controle de infecção por *Trypanosoma evansi* em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p.1357-1362, 2008.

DOAK, S.H. et al. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. **Mutation Research**, v. 745, p. 104-111, 2011.

FENG, Y.; LIU, W.; SHI, D. 2013. Effectiveness of Egg Yolk Antibody Against Shiga Toxin II Variant Toxicity In Vitro and In Vivo. **Current Microbiology**, v. 67, p. 448–453, 2013.

HOARE, C. A. **The Trypanosomes of mammals: a zoological monograph**. Oxford: Blackwell, p.555-593, 1972.

MULVEY, G.L. et al. Therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Clostridium difficile* infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 1181-1187, 2011. doi: 10.1099/jmm.0.029835-0.

NUNES, J. T. S. et al. Occurrence of *Trypanosoma evansi* in Horses in the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, In Press, 2011.

POLSON, A. et al. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. **Immunological Communications United States**, v. 9, n. 5, p. 475-93, 1980.

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 6-31, 2003.

SCHADE, R. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternatives to Laboratory Animals: ATLA**, England, v.33, p. 1-26. 2005.

SILVA, R. A. M. S. et al. Quimioterapia das Tripanossomoses ocorrentes no Pantanal. Corumbá: **Embrapa Pantanal**, 2004, 26 p.

VEGA, C.G. et al. IgY Antibodies Protect against Human Rotavirus Induced Diarrhea in the Neonatal Gnotobiotic Piglet Disease Model. **PLoS ONE**, v.7, n.8, 2012.

WOOLLEY, A.; LANDON, J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. **Journal of Immunological Methods**, v. 178, p. 253-265, 1995.

ZHEN, Y.H. et al. Efficacy of specific IgY for treatment of lipopolysaccharide induced endotoxemia using a mouse model. **Journal of Applied Microbiology**, v. 11, p. 1524-1532, 2011.