LEANDRO RODRIGUES FERREIRA

Reatividade de “tripanosomatídeos inferiores”: *B. culicis*, *C. deanei*, *C. fasciculata*, *C. luciliae*, *H. samuelpessoai*, *L. seymouri*, *P. serpens* e *W. inconstans* com anticorpos de hospedeiros humanos e cães infectados com *Leishmania* sp. e *T. cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Parasitologia

Orientador: Dra. Eufrosina Setsu Umezawa

São Paulo
2010

RESUMO

FERREIRA, L. R. **Reatividade de “tripanosomatídeos inferiores”**: *B. culicis*, *C. deanei*, *C. fasciculata*, *C. luciliae*, *H. samuelpessoai*, *L. seymouri*, *P. serpens* e *W. inconstans* com anticorpos de hospedeiros humanos e cães infectados com *T. cruzi* e *Leishmania* sp. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Os “tripanosomatídeos inferiores”, que infectam plantas e insetos, apresentam propriedades bioquímicas e moleculares similares a *Leishmania* sp e *Trypanosoma cruzi*. Similaridades antigênicas entre estes parasitas são conhecidas à muito tempo, mas somente alguns poucos estudos comparativos sobre a imunorreatividade humoral cruzada foram descritos. No presente trabalho nós analisamos a imunorreatividade cruzada de extratos antigênicos totais de oito “tripanosomatídeos inferiores” por ELISA, com soros de humanos e cães infectados com *T. cruzi* e *Leishmania* sp. Segundo as positivities e dados de reatividade média para ELISA os “tripanosomatídeos inferiores” foram divididos em dois grupos. ELISA-G1 compreendeu 4 parasitas para os quais se obtiveram 100% de positividade e elevadas médias de absorbância, similar aos dados obtidos para *L. chagasi* para hospedeiros humanos e cães. Nos casos humanos, soros de pacientes chagásicos crônicos apresentaram 100% de positividade somente para o ELISA com *T. cruzi*, sem diferenças entre os “tripanosomatídeos inferiores”. Por outro lado amostras de doenças não relacionadas apresentaram baixa reatividade cruzada com os “tripanosomatídeos inferiores”. Apesar da sua posição taxonômica em várias sessões e sua antiga divergência estes resultados mostraram semelhança antigênica entre os “tripanosomatídeos inferiores” e os patogênicos, e podem ser uma fonte alternativa de antígenos para a detecção de anticorpos principalmente em casos de leishmaniose visceral.

Palavras-chave: Imunorreatividade cruzada. “Tripanosomatídeos inferiores”. *Leishmania* sp. *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

FERREIRA, L. R. **Reactivity of “lower trypanosomatids”**: *B. culicis*, *C. deanei*, *C. fasciculata*, *C. luciliae*, *H. samuelpessoai*, *L. seymouri*, *P. serpens* and *W. inconstans* with anti-*Leishmania* sp. and anti-*T. cruzi* antibodies from human and canine hosts. 2010. 83 p. Master thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

"Lower trypanosomatids", that infect plant and insect, present biochemical and molecular similarities to *Leishmania* sp and *Trypanosoma cruzi*. Antigenic similarities between those parasites are known for a long time, but only few comparative investigations about immune humoral cross-reaction were described. In the current work we analyze the cross-immunoreactivity of crude extract from eight “lower trypanosomatids” by ELISA, with human and dog host samples infected with *T. cruzi* and *Leishmania* sp. ELISA positivity and data of mean title of human or dog visceral leishmaniasis cases, the “lower trypanosomatids” were divided in two groups. ELISA-G1 comprised by 4 parasites resulted in 100% positivity and high mean of absorbance, similar data to those obtained with *L. chagasi*, with human or dog hosts. In human cases, Chagas disease chronic cases showed 100% positive only with ELISA performed with *T. cruzi*, with no differences among “lower trypanosomatids”. Otherwise samples with other non correlated disease presented low cross-reaction with “lower trypanosomatids”. In spite of, their taxonomic position in various sections and their old divergence these results showed a strong antigenic similarity between pathogenic and “lower trypanosomatids”, and could be an alternative source of antigen for the detection of antibodies against host mainly with visceral leishmaniasis cases.

Keywords: Cross-reactivity. “Lower-trypanosomatids”. *Leishmania* sp. *Trypanosoma cruzi*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os tripanosomatídeos

A família *Trypanosomatidae* é composta por protozoários flagelados de ampla distribuição na natureza que podem ser encontrados parasitando cada principal grupo de eucariotos (MCGHEE e COSGROVE 1980; VICKERMAN, 1994). Esses protozoários estão divididos em nove diferentes gêneros, além de três taxa com posição incerta, os gêneros *Wallaceina*, *Angomonas* e *Strigomonas*.

Os monoxenos são parasitas de insetos e compreendem os gêneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, e *Rhyncoidomonas*, os heteroxenos são parasitas de insetos e vertebrados (*Endotrypanum*, *Leishmania*, e *Trypanosoma*) ou de insetos e plantas (*Phytomonas* sp.) (DOLLET, 1984; MCGHEE e COSGROVE, 1980).

A morfologia dos membros da família *Trypanosomatidae* é relativamente heterogênea, apresentando formas que variam de ovais a piriformes com dimensão entre 4 a 130 µm de extensão (MCGHEE e COSGROVE, 1980). Todavia compartilham características celulares como trans-splicing, edição de RNA mitocondrial, organização peculiar do DNA nuclear, e DNA mitocondrial com mini e maxicírculos, formando o cinetoplasto, estrutura contígua a mitocôndria, característica da família que pode conter aproximadamente 5% do DNA do parasito (MCGHEE e COSGROVE, 1980; SANTOS et al., 2006). Muitos tripanosomatídeos são parasitas digenéticos que apresentam em seu ciclo de vida, dependendo do hospedeiro que habitam (inseto ou vertebrado), formas evolutivas distintas, tal como ocorre com as espécies de importância médica, *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* sp, Outros como os do gênero *Phytomonas* causam patologia em vegetais de interesse econômico e são transmitidos a seus hospedeiros por insetos hemípteros fitófagos (BREGANÓ et al., 2003; CAMARGO, 1999).

Gêneros de tripanosomatídeos de insetos e plantas são informalmente reconhecidos como “tripanosomatídeos inferiores” (SANTOS et al., 2006) essa classificação considerando previamente características morfológicas e de ciclo de vida, atualmente esta sendo revista em função dos avanços na sistemática molecular (SANTOS et al., 2006). Esses protozoários

dispõem de ampla distribuição geográfica e são de certa forma “promíscuos”, já que, apresentam baixa especificidade à seus hospedeiros invertebrados (PODLIPAEV, 2000), ocasionando dificuldades quanto à identificação morfológica (CATARINO et al., 2001; WALLACE, 1966; PODLIPAEV, 2000; PODLIPAEV et al., 2001). Embora classicamente não patogênicos ao homem, os “tripanosomatídeos inferiores” tem atraído o interesse como potenciais modelos para o estudo de vários mecanismos biológicos dos Trypanosomatidae. É consensual no meio científico a importância da realização de estudos com “tripanosomatídeos inferiores”, pois esses organismos podem contribuir sobremaneira para um maior conhecimento de modelos de nutrição, bioquímica, quimioterapia e biologia molecular dos tripanosomatídeos de interesse médico. Essa possibilidade é reforçada pela demonstração de que diferentes espécies não patogênicas ao homem, compartilham moléculas homólogas a fatores de virulência encontrados em tripanosomatídeos classicamente patogênicos (D’ÁVILA-LEVY et al., 2003; INVERSO et al., 1993; SANTOS et al., 2006). Além disso, são facilmente cultiváveis em condições axênicas, a baixo custo (SANTOS et al., 2006).

1.2 Moléculas de superfície de tripanosomatídeos

A similaridade molecular entre flagelados de plantas e insetos com os tripanosomatídeos de mamíferos e causadores de importantes patologias humanas tem despertado interesse de pesquisadores ao longo dos anos (MCGHEE e COSGROVE, 1980; PODLIPAEV, 2000; VICKERMAN, 1994; WALLACE, 1966). Nesse sentido estudos pioneiros que tiveram início na década de sessenta mostraram, por exemplo, a capacidade de tripanosomatídeos de insetos infectarem células de mamíferos (MCGHEE e COSGROVE, 1980; WALLACE, 1966). Um pouco mais tarde outro estudo mostrou que a glândula odorífera de marsupiais Didelfídeos (gambá), suporta o crescimento desses tripanosomatídeos por no mínimo seis meses (JANSEN et al., 1988). Alternativamente foi demonstrado que *Crithidia deanei* e *Herpetomonas roitmani* são capazes de “*in vitro*” infectar e sobreviver em fibroblastos de pele de camundongo (SANTOS et al., 2004). Não surpreendentemente há ainda descrições de infecção em humanos imunossuprimidos, com quadros clínicos

associados, mimetizando condição de leishmaniose cutânea (BOISSEAU-GARSAUD et al., 2000) e visceral (JIMÉNEZ et al., 1996; PACHECO et al., 1998).

Um dos aspectos que podem refletir essa capacidade de infecção e adaptação desses tripanosomatídeos está sem dúvida no repertório molecular que os mesmos apresentam. Alguns estudos têm demonstrado que os “tripanosomatídeos inferiores” compartilham porção significativa de seu maquinário celular com espécies classicamente patogênicas (BREGANÓ et al., 2003; LOPES et al., 1981; SANTOS et al., 2006; SOUZA et al., 1974; 1980). O compartilhamento dessas moléculas provavelmente tem suas bases em pressões seletivas para manutenção de um repertório molecular que favoreça a sobrevivência quando parasitando o hospedeiro inseto, evento comum entre tripanosomatídeos monoxenos e os gêneros de interesse médico (FERGUSON, 1997; MCGEE e COSGROVE, 1980).

Os principais componentes da arquitetura de membrana desses protozoários são moléculas ancoradas via glicosilfosfatidilinositol (GPI) (FERGUSON, 1997).

Três classes principais de moléculas correspondem a componentes quantitativamente predominantes como elementos constituintes da arquitetura de membrana dos tripanosomatídeos, são eles: os glicosilinositolfosfolípidos (GIPLS), as próprias ancoras de GPIs (FERGUSON, 1997) e glicoproteínas proteolíticas (SANTOS et al., 2006). As glicoproteínas proteolíticas (proteases) apresentam-se bem caracterizadas como moléculas da superfície da membrana dos tripanosomatídeos patogênicos, principalmente a metaloprotease GP63 em *Leishmania* e cisteino-proteinase (cruzipaina) em *T. cruzi*. As proteases são moléculas que apresentam relevante papel na relação parasita hospedeiro sendo implicadas em diversas funções como virulência, patogênese, replicação, nutrição, evasão imune entre outras (NORTH, 1982; CHAUDHURI e CHANG, 1988; MEDINA-ACOSTA et al., 1989; HEY et al. 1994, MCGWIRE et al., 2003). Recentemente vários estudos com proteases tem demonstrado seu potencial como alvo para agentes quimioterápicos (CHENIK et al., 2006) ou na elaboração de vacinas (BEVERLEY et al., 2005; CHENIK et al., 2006). Grande variedade de proteases homólogas principalmente a GP63 de *Leishmania* foram encontradas amplamente distribuídas nos “tripanosomatídeos inferiores” (NORTH, 1982; MCKERROW et al., 1993; BRANQUINHA, 1996; SANTOS et al., 2005). Em 1992, um trabalho pioneiro realizado por Etges mostrou em parasitas dos gêneros *Crithidia* e *Herpetomonas* a presença de

metaloproteases de superfície com propriedades bioquímicas similares a GP63. Desde então especula-se que essa protease poderia estar envolvida na interação parasito-hospedeiro inseto (ETGES, 1992; SANTOS et al., 2002). Trabalhos recentes têm mostrado, por exemplo, que *Herpetomonas samuelpessoai* é capaz de liberar para o meio extracelular metaloprotease de superfície com 63 kDa (SANTOS et al., 2002). Essas metaloproteases se assemelham muito bioquimicamente à GP63 devido a características comuns como localização na superfície celular, ancoragem via GPI e sensibilidade a inibidores de metaloproteases como a 1,10-phenanthroline (SCHNEIDER e GLASER, 1993). Da mesma forma foram caracterizadas metaloproteases extracelulares bioquimicamente homólogas a GP63 com migração eletroforética entre 50 e 100 kDa em vários tripanosomatídeos inferiores como *Phytomonas serpens* (VERMELHO et al., 2003), *Crithidia guilhermei* (D'AVILA-LEVY et al., 2001), *Crithidia fasciculata* (BRANQUINHA et al., 1996), *Crithidia oncopelti* (D'AVILA-LEVY et al., 2001), *Crithidia lucilae* (BRANQUINHA et al., 1996), *Blastocrithidia culicis* (D'AVILA-LEVY et al., 2005) entre outros. Características comuns dessas proteases incluem um domínio catalítico zinco dependente, múltiplas posições para glicosilação, e ancoragem à membrana via GPI.

Outras moléculas, conforme já citado, importantes nesse contexto são os GPIs, uma família de glicolipídeos amplamente distribuída na natureza e implicados em importantes funções biológicas. Os GPIs ocorrem de maneira mais abundante nos protozoários parasitas atuando na integração de glicoproteínas, glicolipídeos e fosfossacarídeos à membrana celular (TURCO et al., 2001). Essas moléculas foram pouco estudadas nos tripanosomatídeos inferiores, porém estão bem caracterizados em tripanosomatídeos causadores de patologias em mamíferos (TURCO et al., 2001). Nesses parasitos apresentam-se estruturalmente com 3 tipos distintos, tipo 1, 2 e híbrido estando envolvidas em vários processos celulares como, sinalização de membrana, tráfego intracelular (FERGUSON, 1999) e também na interação parasita- hospedeiro conforme demonstrado em *T. cruzi*, pela indução de resposta inflamatória (ALMEIDA e GAZZINELI, 2001), ativação policlonal de linfócitos B e apoptose de macrófagos “in vitro” (PREVIATO et al., 2004).

Os GPIs também podem ser encontrados em protozoários parasitas formando glicolipídeos de superfície não ligados a proteínas como os Glicosilinositolfosfolípides (GIPLS), lipofosfoglicana (LPG) principalmente no gênero *Leishmania* (FERGUSON, 1997) e

lipopeptidofosfoglicana (LPPG) em *T. cruzi*. (PREVIATO et al., 2004; DE LEDERKREMER et al., 1991). Os GIPLS são a principal família de moléculas de glicolípídeos não ligados a proteínas e polissacarídeos sintetizados por *Leishmania* sp e *T. cruzi* (TURCO et al., 2001; FERGUSON, 1997). Nas espécies de *Leishmania* são expressos abundantemente formando uma densa camada sobre a superfície das amastigotas e promastigotas, fato que também ocorre nos tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* (FERGUSON, 1999).

Outras moléculas de natureza sacarídica ligadas a GPI podem ser comuns aos tripanosomatídeos, a exemplo de resíduos glicosídicos de galactofuranose (Gal_f), reconhecido por soros de pacientes infectados com *T. cruzi* e descrito em glicolípídeos de *Leishmania major* e em *Crithidia* (MENDELZON e PARODI, 1985; DE LEDERKREMER e COLLI, 1995).

O papel desempenhado por diferentes glicolípídeos na interação parasita- hospedeiro não é muito conhecido, porém o uso de receptor de manose para ligação da *Leishmania* ao macrófago, por exemplo, sugere que GILPs ricos em manose possam ter papel importante na invasão celular (SACKS e KAMHAWI, 2001). De fato, enzimas envolvidas na biosíntese de GILPs são essenciais para a virulência do parasita, enfatizando a importância dos glicolípídeos na viabilidade dos mesmos (TURCO et al., 2001). Os GIPLS estão também presentes em outras espécies de tripanosomatídeos como *Crithidia fasciculata*, *Herpetomonas samuelpessoai*, *Leptomonas samueli* e *Endotrypanum* com estrutura semelhante aos de *Leishmania* e *T. cruzi* (TURCO et al., 2001). A estrutura comum aos GIPLS corresponde a um motivo estrutural definido como Man α 1-4GlcN α 1-6-myoinositol-1-HPO₄-lipídio (FERGUSON, 1997). Todavia também são encontradas diferentes moléculas de lipídeos compondo a estrutura dos GILPs de diferentes tripanosomatídeos. Foi demonstrado que espécies como *T. cruzi*, *L. samueli*, *C. lucilae*, *H. samueli* e *E. schaudinii* sintetizam fosfoesfingolípídeos, enquanto *L. alderi*, *L. tarentolae* e *P. serpens* sintetizam glicerofosfolípídeos (ROUTIER et al., 1995). Esses achados sugerem que estruturas específicas sobre a superfície celular podem estar envolvidas na interação hospedeira parasita específica. Entretanto tais diferenças na estrutura podem não ser funcionalmente significativas e apenas refletir uma expansão do sistema enzimático para a síntese tanto de Ceramida PI quanto Glicerolípídeo PI (ROUTIER et al., 1995).

Em relação especificamente a *Leishmania*, a LPG, moléculas da família dos GIPLs, e das mais abundantes da superfície celular, apresenta-se ancorada por GPI do tipo 2 e ligada a um longo domínio repetitivo de polissacarídeos os quais possuem modificações espécies específicas de cadeia lateral (TURCO e DESCOTEAUX, 1992). Essas estruturas não possuem análogos em eucariotos superiores e podem representar uma vantagem evolucionária de adaptação ao modo de vida do parasita (FERGUSON, 1999). As diferenças espécies específicas na estrutura da LPG parecem desempenhar um papel importante em definir a espécie de vetor utilizada pelo parasita (PIMENTA et al., 1994). A LPG tem sido implicada em inúmeras funções nos hospedeiros vertebrados, como por exemplo, alguns experimentos "in vitro" tem demonstrado potencial proteção de promastigotas contra lise mediada por complemento e função de receptor mediando a endocitose por macrófagos. Além disso, dentro do macrófago atua inibindo o "burst" oxidativo e a fusão endosoma-fagossoma.

Desta forma foi relacionada como um fator de virulência principalmente na interação com o hospedeiro vetor, já que, experimentos em animais experimentais ainda são conflitantes a esse respeito (TURCO et al., 2001). Embora ainda pouco estudado, alguns trabalhos tem demonstrado que Tripanosomatídeos inferiores como *C. fasciculata*, *L. samueli* e *Endotrypanum schaudinni* apresentam genes homólogos a LPG1 de *Leishmania* (ZHANG et al., 2004)

1.3 Imunorreatividade cruzada entre tripanosomatídeos

O compartilhamento de determinantes antigênicos entre tripanosomatídeos é um fenômeno conhecido e descrito desde a década de 60. Trabalho pioneiro de Camargo em 1969 mostrou a presença de imunorreatividade cruzada entre *T. cruzi* e *Leishmania*. Especificamente a imunorreatividade cruzada entre os tripanosomatídeos de interesse médico é de fato bem demonstrada na literatura, atestada por diferentes metodologias de imunodiagnóstico (CAMARGO et al., 1969; MALCHIODI et al., 1994; VEXENAT et al., 1996; SILVEIRA et al., 2001; MARCIPAR et al., 2005) . Principalmente a utilização de antígenos totais, obtidos a partir de extratos de formas de cultivo desses parasitos frequentemente carece de especificidade quando utilizados na discriminação sorológica entre os mesmos,

fato que ilustra a extensão do compartilhamento de antígenos entre esses importantes patógenos. Nessa linha diferentes autores descreveram como foco a caracterização parcial por Western blotting dos antígenos compartilhados entre esses organismos, demonstrando a ampla variedade de antígenos, de diferentes pesos moleculares, comuns a *Leishmania* e *T. cruzi*. (MALCHIODI, 1994; ROMERO et al., 2005).

Outros estudos realizados na década de 70 mostraram por Imunofluorescência Indireta (IFI) reatividade cruzada entre parasitos do gênero *Crithidia* e soros de pacientes com leishmaniose visceral. Devido a facilidades de obtenção e cultivo das *Crithidias* os autores sugeriram a possibilidade da sua utilização como antígeno no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral, apesar da necessidade de maiores estudos (HEDGE et al., 1978). Um ano depois baseado no trabalho de Hedge et al. (1978), foi mostrado também por IFI a presença de elevados títulos de anticorpos no soro de quatro pacientes com leishmaniose visceral, reativos para *Crithidia* (LOPEZ-BREA, 1979). Alguns trabalhos também demonstram a existência de antígenos comuns entre tripanosomatídeos inferiores e o *T. cruzi*. Por exemplo, a imunização de camundongos com formas de cultivo de “tripanosomatídeos inferiores” induziu proteção parcial contra infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* (SOUZA e ROITMAN, 1971; SOUZA et al., 1974). Da mesma forma, soro de camundongo imunizado com tripanosomatídeos de insetos reage cruzadamente com extrato antigênico total de *T. cruzi*, identificado por imunodifusão (SOUZA et al., 1974). Nesta mesma época também foi verificado que soros de pacientes com doença de Chagas aglutinavam formas de cultivo de *Crithidia oncopelti* assim como com formas epimastigotas de *T. cruzi*. Uma pré-absorção desses soros com *C. oncopelti* removia parcialmente a capacidade de aglutinação (VATTUONE et al., 1971). Todavia a primeira tentativa de utilizar “tripanosomatídeos inferiores” no diagnóstico sorológico da doença de Chagas foi descrita por Lopes et al. (1981) que avaliou por IFI, aglutinação direta e fixação de complemento a imunoreatividade cruzada entre antígenos de diversas espécies dos gêneros *Crithidia*, *Herpetomonas* e *Leptomonas* com soro de pacientes chagásicos. Pesquisa mais recente demonstrou, por ensaios de sorologia convencional, reatividade não espécie-específica de soros de pacientes chagásicos com antígenos de *Phytomonas serpens* (BREGANÓ et al., 2003). Por outro lado soros hiperimunes de camundongos e coelhos imunizados com *P. serpens* reagiram intensamente com *P. serpens* e *T. cruzi*. Os camundongos imunizados apresentaram significativa redução da

parasitemia e mortalidade quando desafiados com *T. cruzi* e comparados a animais controles não imunizados (BREGANÓ et al., 2003).

Ampla homologia antigênica entre os diferentes grupos de tripanosomatídeos não é surpreendente dado que na literatura encontram-se relatos de reatividade cruzada entre representantes das duas linhagens divergentes dos tripanosomatídeos, os *Stercoraria* e os *Salivaria* (DESQUESNES et al., 2007; MONZON e COLMAN, 1988).

Os dados relacionados nessa introdução tem aberto a possibilidade da utilização de antígenos heterólogos provenientes desses tripanosomatídeos para o diagnóstico sorológica das espécies patogênicas (BREGANÓ et al., 2003; DESQUESNES et al., 2007; LOPES, 1981; MONTEÓN et al., 1997; MARTINKOVIC e MARINKULIC, 2006). De fato esses dados sugerem fortemente a existência de moléculas comuns entre os tripanosomatídeos não patogênicos e os de interesse médico. Fica claro a existência de uma relação direta dessas moléculas e a imunorreatividade cruzada encontrada entre esses tripanosomatídeos. Poucos trabalhos têm avaliado de forma crítica essa relação. O estudo desta imunorreatividade pode permitir a caracterização de epitopos comum entre os tripanosomatídeos aqui considerados. É fato que o estudo dos tripanosomatídeos inferiores tem contribuído muito para melhor compreensão dos processos biológicos das suas contrapartes patogênicas. Além disso, a facilidade de cultivo dos mesmos com pouca exigência técnica e baixo custo tem estimulado seu estudo, e os tem estabelecido como organismos modelo (SANTOS et al., 2006).

Baseados nos poucos trabalhos anteriormente publicados na literatura relacionada e propondo uma análise crítica da reatividade de diferentes tripanosomatídeos, o objetivo geral de nosso estudo é avaliar comparativamente a reatividade de extratos antigênicos dos tripanosomatídeos monoxenos de insetos: *Crithidia fasciculata*, *Crithidia luciliae*, *Crithidia deanei*, *Leptomonas seymouri*, *Blastocrithidia culicis*, *Wallaceina inconstans* e a espécie heteroxena *Phytomonas serpens* com anticorpos anti-*Leishmanias* e anti-*T. cruzi*, presentes em soros de pacientes e cães infectados com estes protozoários, além de soros de indivíduos com doenças não relacionadas utilizando as reações de ELISA.

8 CONCLUSÕES PARCIAIS

1- Hospedeiros com leishmaniose visceral, humanos ou caninos, foram os únicos capazes de dividir os 8 “tripanosomatídeos inferiores” em dois grupos (G1 e G2) dos quais as maiores reatividades foram obtidas com a *C. fasciculata*, *C. luciliae*, *H. samuelpessoai* e *L. seymouri* , com médias de reatividade similares àquela apresentada pelo antígeno homólogo a *L. chagasi*.

2- Os oito “tripanosomatídeos inferiores” apresentaram reatividades similares e menores do que aquela apresentada pelo antígeno *T. cruzi* na análise de hospedeiros infectados com o *T. cruzi*.

3- Os oito “tripanosomatídeos inferiores” apresentaram dados de reatividade semelhantes às apresentadas pelo *L. chagasi* e *T. cruzi* na análise de hospedeiros (humanos ou cães) com diferentes doenças infecciosas e auto-imunes.

REFERÊNCIAS

- AARDEN, L. A.; DE GROOT, E. R.; FELTKAMP, T. E. Immunology of DNA. III. *Crithidia luciliae*, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, n. 254, p. 505-515, 1975.
- ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. **J. Leukoc. Biol.**, v. 70, n. 4, p. 467-477, 2001.
- ALVES, W. A. e BEVILACQUA, P. D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.
- ATTA, A. M.; COLOSSI, R.; SOUSA-ATTA, M. L.; JERONIMO, S. M.; NASCIMENTO, M. D.; BEZERRA, G. F.; ORGE, G.; CARVALHO, E. M. Antileishmanial IgG and IgE antibodies recognize predominantly carbohydrate epitopes of glycosylated antigens in visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, 525-530, 2004.
- AVILA, J. L.; ROJAS, M.; ACOSTA, A. Glycoinositol phospholipids from American Leishmania and *Trypanosoma* spp: partial characterization of the glycan cores and the human humoral immune response to them. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 10, p. 2305-2312, 1991.
- BARBOSA DE DEUS, R.; DOS MARES-GUIA, M. L.; NUMES, A. Z.; COSTA, K. M.; JUNQUEIRA, R. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; TAVARES, C. A. *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 6, p. 1361-6, 2002.
- BEVERLEY, S. M.; OWENS, K. L.; SHOWALTER, M.; GRIFFITH, C. L.; DOERING, T.L.; JONES, MCNEIL, V. C., M. R. Eukaryotic UDP-galactopyranose mutase (GLF gene) in microbial and metazoal pathogens. **Eukaryotic. cell**, v. 4, n. 6, p. 1147-1154, 2005.
- BOISSEAU-GARSAUD, A. M.; CALES-QUIST, D.; DESBOIS, N.; JOUANNELE, J.; JOUANNELE, A.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P. A new case of cutaneous infection by a presumed monoxenous trypanosomatid in the island of Martinique (French West Indies). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, n. 1, p. 51-52, 2000.
- BRANQUINHA, M. H.; VERMELHO, A. B.; GOLDENBERG, S.; BONALDO, M. C. Ubiquity of cysteine- and metalloproteinase activities in a wide range of trypanosomatids. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 43, n. 2, p. 131-135, 1996.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BREGANÓ, J. W.; PICÃO, R. C.; GRAÇA, V. L.; MENOLLI, R. A.; JANKEVICIUS, S. I.; PINGE, F. P.; JANKEVICIUS, J. V. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. **Fems. Imm. Med. Micro.**, v. 39, n. 3, p. 257-264, 2003.

CAMARGO, M. E.; REBONATO, C. Cross-reactivity in immunofluorescence test for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. **Amer. J. trop. Med. Hyg.**, n. 18, p. 500-505, 1969.

CAMARGO, E. P. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Adv. Parasitol.**, v. 42, p. 29-112, 1999.

CATARINO, L. M.; SERRANO, M. G.; CAVAZZANA, J.R. M.; ALMEIDA, M. L.; KANESHINA, E. K.; CAMPANER, M.; JANKEVICIUS, J. V.; TEIXEIRA, M. M. G. e ITOW – JANKEVICIOUS S. Classification of trypanosomatids from fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 201, n.1, p. 65-72, 2001.

CAZZULO, J.; STOKA, V.; TURK, V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease., **Curr. Pharm. Des.**, v. 7, n. 12, p. 1143-1156, 2001.

CHAUDHURI, G.; CHANG, K. P. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, n. 1, p. 43-52, 1988.

CHENIK, K.; LAKHAL, S.; BEN, K.; ZRIBI, L.; LOUZIR, H.; DELLAGI, K. Approaches for the identification of potential excreted proteins of *Leishmania* major parasites. **Parasitology**, v.132, n. 4, p. 493-509, 2006.

CHICHARRO, C.; ALVAR, J. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 1, p. 75-78, 2003.

SILVEIRA J. F.; UMEZAWA, E. S.; LUQUETI, A. O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends. Parasitol.**, n. 6, p. 286-291, 2001.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v. 19, n. 1, p. 241-266, 2009.

D'AVILA-LEVY, C. M.; NOGUEIRA, M. A. C.; VERMELHO, A. B.; BRANQUINHA, M. H. Differential expression of proteolytic enzymes in endosymbiont-harboring *Crithidia* species. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 202, n. 1, p. 73-77, 2001.

D'AVILA-LEVY, C. M.; SOUZA, R. F.; GOMES, R. C.; VERMELHO, A. B.; BRANQUINHA, M. H. A metalloproteinase extracellularly released by *Crithidia deanei*. **Canad. J. Microb.**, v. 49, n. 10, p. 625–632, 2003.

D'AVILA-LEVY, C. M.; ARAÚJO, F. M.; VERMELHO, A. B.; SOARES, R. M.; SANTOS, A. L.; BRANQUINHA, M. H. Proteolytic expression in *Blastocrithidia culicis*: influence of the endosymbiont and similarities with virulence factors of pathogenic trypanosomatids. **Parasitology**, v. 130, 413-420., 2005.

D'AVILA-LEVY, C. M.; DIAS, F. A.; NOGUEIRA, A. C.; MARTINS, J. L.; LOPES, A. H. C. S.; SANTOS, A. L. S.; VERMELHO, A. B.; BRANQUINHA, M. H. Insights into the role of gp63-like proteins in insect trypanosomatids. **FEMS. Microbiol. Lett.**, n. 254, p.149–156, 2006.

DEDET, J. P.; PRATLONG, F. Leishmania, Trypanosoma and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 47, n. 1, p. 37-39, 2000.

DE LEDERKREMER, R. M.; COLLI, W. Galactofuranose-containing glycoconjugates in trypanosomatids. **Glycobiology**, v. 5, n. 6, p. 547-552, 1995.

DE LEDERKREMER, R. M.; LIMA, C.; RAMIREZ, M. I.; FERGUSON, M. A.; HOMANS, S. W.; THOMAS-OATES, J. Complete structure of the glycan of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 35, p. 23670-23675, 1991.

DESQUESNES, M.; MARIE-FRANCE, B.; SIMONE, F. B. Detection of Chagas infections using *Trypanosoma evansi* crude antigen demonstrates high cross-reactions with *Trypanosoma cruzi*. **Infec. Genet. Evol.**, v. 8, n. 4, p. 457-462, 2007.

DESQUESNES, M.; TRESSE, L. Utilisation of *T. evansi* antigens in indirect-ELISA for the diagnosis of *Trypanosoma* sp. In livestock. THE FIRST SYMPOSIUM ON NEW WORLD TRYPANOSOMES, 1999, Guyana. Abstracts...Georgetown: Proceedings of first symposium on new world trypanosomes,1999. p. 105-110, Res. 1.

DOLLET, M. Plant diseases caused by flagellate Protozoa (Phytomonas). **Ann. Rev. Phytopatol.**, v.22, n. 115-132, 1984.

ELIAS, C. G.; AOR, A. C.; VALLE, R. S.; D'AVILA-LEVY, C. M.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. Cysteine peptidases from *Phytomonas serpens*: biochemical and immunological approaches. **FEMS. Immunol. Med. Microbiol.**, v. 57, n. 3, p. 247-256, 2009.

ETGES, R. Identification of a surface metalloproteinase on 13 species of Leishmania isolated from humans, *Crithidia fasciculata*, and *Herpetomonas samuelpessoai*. **Acta. Trop.**, v. 50, n. 3, p. 205-217, 1992.

FERNANDES, A. P.; NELSON, K.; BEVERLEY, S. M. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.90, n. 24, p. 11608-11612, 1993.

FERGUSON, M. A. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 352, n. 1359, p. 1295-1302, 1997.

FERGUSON, M. A. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. **J. cell. science**, v. 112, n. 17, p. 2799-2809, 1999.

FERRER, L.; AISA, M. J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Vet. Rec.**, v. 136, n.20, p.514-546., 1995.

FISHER-SMIKLE, M.; JAMES, O. B. Diagnosis of systemic lupus erythematosus in Jamaica by *Crithidia luciliae* indirect immunofluorescence test. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 2, p. 255-256, 1987.

GALILI, U.; RACHMILEWITZ, E. A.; PELEG, A.; FLECHNER, I. A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. **J. Exp. Med.**, v. 1, n. 160, p. 1519-1531, 1984.

GAZZINELLI, R. T.; ROMANHA, A. J.; FONTES, G.; CHIARI, E.; GAZZINELLI, G.; BRENNER, Z. Distribution of carbohydrates recognized by the lectins *Euonymus europaeus* and concanavalin A in monoxenic and heteroxenic trypanosomatids. **J. Protozool.**, v. 38, n. 4, p. 320-305, 1991.

GOLGHER, D. B.; COLLI, W.; SOUTO-PADRÓN, T.; ZINGALES, B. Galactofuranose-containing glycoconjugates of epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 60, n. 2, p. 249-264, 1993.

GOMES, A. P. S.; CORDEIRO, R. L. R. Reação cruzada no diagnóstico sorológico de leishmaniose canina. **Ver. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 23, n. 1, p. 238, 2004.

GONTIJO, C. M.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, desafios e Perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.**, v, 8, n. 4, p.419-433, 2010.

GRIMALDI, G.; SCHOTTELIUS, J. Leishmaniasis--their relationships to monoxenous and dioxenous trypanosomatids. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 190, n. 1-2, p. 3-8, 2001.

GRIEMBERG, G.; FERRAROTTI, N. F.; SVIBEL, G.; RAVELLI, M. R; TARANTO, N.; MALCHIODI, E. L.; PIZZIMENTI, M. C. Inmunofluorescencia con *Crithidia luciliae* para la deteccion de anticuerpos anti-adn: imagenes atipicas y su relacion con enfermedad de chagas y leishmaniasis: imagenes atipicas y su relacion con enfermedad de chagas y leishmaniasis / Immunofluorescence assay with *Crithidia luciliae* for the detection of anti-DNA antibodies: atypical images and their relationship with Chagas' disease and leishmaniasis. **Med. B. Aires**, v. 66, n. 1, p. 3-8, 2006.

GRISARD, E. C. Salivaria or Stercoraria? The *Trypanosoma rangeli* dilemma. **Kinetoplastid. Biol. Dis.**, v. 1, n. 1, p. 5, 2002.

HEDGE E. C.; MOODY A. H.; RIDLEY, D. S. An easily cultured *Crithidia* sp. as antigen for immunofluorescence for kala-azar. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, n. 4, p. 445, 1978.

HEY, A. S.; THEANDER, T. G.; HVIID, L.; HAZRATI, S. M.; KEMP, M.; KHARAZMI, A. The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells. **J. Immunol.**, v. 152, p. 4542-4548., 1994.

HSIAO, C. H.; YAO, C.; STORLIE, P.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi*. **Mol. Bioc. Hem. Parasitol.**, v. 157, n. 2, p. 148-159, 2008.

INVERSO, J. A.; MEDINA-ACOSTA E.; O'CONNOR J.; RUSSELL D. G.; CROSS G. A. *Crithidia fasciculata* contains a transcribed leishmanial surface peptidase (gp63) gene homologue. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 57, n. 47-54, 1993.

JAFFE, C. L.; DWYER, D. M. Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. **Parasitol. Res.**, v. 91, n. 3. p. 229-237, 2003.

JANSEN, A. M.; CARREIRA, J. C.; DEANE, M. P. Infection of a mammal by monogenetic insect trypanosomatids (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 271-272, 1988.

JIMÉNEZ, M. I; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MOLINA, R.; CANÁVATE, C.; ALVAR, J. HIV co-infection with a currently non-pathogenic flagellate. **Lancet**, v. 347, n. 8996, p. 264-265, 1996.

KURSTAK, E. Progress enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design, and interpretation. **Bull. World Health Organ.**, v. 63, n. 4, p. 793-811, 1985.

LOPES, J. D.; CAULADA, Z.; BARBIERI, C. L.; CAMARGO, E. P. Cross-reactivity between *Trypanosoma cruzi* and insect trypanosomatids as a basis for the diagnosis of Chagas disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 30, n. 6, p. 1183-1188, 1981.

LOPEZ-BREA, M.; ITURRIAGA, R.; APARICIO, M. Early serological diagnosis in visceral leishmaniasis using *Crithidia* sp. as antigen. **Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n. 3, p. 348, 1978.

LOPEZ-BREA, M. Diagnóstico serológico por inmunofluorescência indirecta de la leishmaniasis visceral mediante la utilización del protozoo *Crithidia* sp. como antígeno. **Rev. San. Hyg. Public.**, v. 53, p. 1109-1115, 1979.

MALCHIODI, E. L.; CHIARAMONTE M. G.; TARANTO N. J.; ZWIRNER N. W. & MARGNI R. A. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp*; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). **Clin. Exp. Immunol.**, v. 97, n. 3, p. 417-423, 1994.

MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Vet. Parasitol.**, v. 15, n.1, p. 1-9, 1996.

MARCIPAR, I. S.; ROODVELDT, C.; CORRADI, G.; CABEZA, M. L.; BRITO, M. E. F.; FLOETER, L. M. W.; ALBERTO, J. M.; SILBER, A. M. Use of Full-Length Recombinant Calflagin and Its C Fragment for Improvement of Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 11, p. 5498-5503, 2005.

MARTINEZ, J.; CAMPETELLA, O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is antigenic in human infections. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 11, p. 4275-4277, 1991.

MARTINKOVIC, F.; MARINCULIC, A. Antibodies against Leishmania cross-react with Crithidia luciliae: indirect immunofluorescence and Dot-ELISA study in dogs. **Parasitol. Res.**, v. 98, n. 4, p. 378-380, 2006.

MEDINA-ACOSTA, E.; KARESS, R. E.; SCHWARTZ, H.; RUSELL, D. G. The promastigote surface protease (gp63) of Leishmania is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 37, n. 2, p. 263-273, 1989.

MENDELZON, D. H.; PARODI, A. J. N-linked high mannose-type oligosaccharides in the protozoa *Crithidia fasciculata* and *Crithidia hamosa* contain galactofuranose residues. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 5, p. 2129-2133, 1986.

MCGHEE, R. B.; COSGROVE, W. B. Biology and Physiology of the Lower Trypanosomatidae. **Microbiol. Rev.**, v. 44, n. 1, p. 140-173, 1980.

MCGWIRE, B. S.; CHANG, K. P.; ENGMAN, D. M. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan Leishmania is enhanced by surface metalloprotease gp63. **Infection. Immun.**, v. 71, n. 2, p. 1008-1010, 2003.

MCKERROW, J. H.; SUN, E.; ROSENTHAL, P. J.; BOUVIER, J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. **Annu. Rev. Microbiol.**, n. 47, p. 821-853, 1993.

MONTEÓN, V. M.; GUZMÁN-ROJAS, L.; NEGRETE-GARCÍA, C.; ROSALES-ENCINA, J. L.; LOPEZ, P. A. Serodiagnosis of American Trypanosomiasis by Using Nonpathogenic Trypanosomatid Antigen. **J. Clin. Microbio.**, v. 35, n. 12, p. 3316-3319, 1997.

MONZON, C. M.; COLMAN, O. L. R. Seroepidemiologic diagnosis of south american equine trypanosomiasis (Mal de Caderas) by the indirect immunofluorescence test in the province of Formosa (Argentina). 1983-1987. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 40, n. 4, p. 279-285, 1988.

MORAES, C. T.; BOSCH, M.; PARODI, A. J. Structural characterization of several galactofuranose-containing, high-mannose-type oligosaccharides present in glycoproteins of the trypanosomatid *Leptomonas samueli*. **Biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1543-1549, 1988.

MORIO, F.; REYNES, J.; DOLLET, M.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; RAVEL, C. Isolation of a protozoan parasite genetically related to the insect trypanosomatid *Herpetomonas samueli* from a human immunodeficiency virus-positive patient. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 11, p. 3845-3847, 2008.

NILSSON, E.; BIBERFELD, G. Demonstration of antibodies to double-stranded DNA by the *Crithidia luciliae* immunofluorescence test. **J. Clin. Lab. Immunol.**, v. 3, n. 3, p. 191-201, 1980.

NORTH, M. J. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. **Microbiol. Rev.**, v. 46, n. 3, p. 308-340, 1982.

NOYES, H.; PRATLONG, F.; CHANCE, M.; ELLIS, J.; LANOTTE, G; DEDET, J. P. A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* ss. **Parasitology**, v. 124, n. 1, p.17-24, 2002.

OKONG'O-ODERA, E. A.; KURTZHALS, J. A.; HEY, A. S.; KHARAZMI, A. Measurement of serum antibodies against native *Leishmania* gp63 distinguishes between ongoing and previous *L. donovani* infection. **APMIS**, v. 101, n. 8, p.642-646, 1993.

OLIVEIRA, T. M.; FURUTA, P. I.; DE CARVALHO, D.; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.

PACHECO, R. S.; MARZOCHI, M. C.; PIRES, M. Q.; BRITO, C. M.; MADEIRA, M. F.; BARBOSA-SANTOS, E. G. Parasite genotypically related to a monoxenous trypanosomatid of dog's flea causing opportunistic infection in an HIV positive patient. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 4, p. 531-537, 1998.

PINHEIRO, C. H. P.; DE SOUZA, D. S.; KEKLSSEN, E. D.; MENDONÇA, I. L.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L. Recombinant cysteine proteinase from *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* implicated in human and dog T-cell responses. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 6, p.3787-3789, 2005.

PODLIPAEV, S. Insect Trypanosomatids: the Need to Know More. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 517-522, 2000.

PODLIPAEV, S. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, n. 5, p. 648-652, 2001.

PIMENTA, P. F. P.; SARAIVA, E. M. B.; ROWTON, E.; MODI, G. B.; GARRAWAY, L. A.; BEVERLEY, S. M.; TURCO, S. J.; SACKS, D. L. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 91, n. 19, p. 9155-9159, 1994.

PREVIATO, J. O., MENDONCA-PREVIATO, L., JONES, C.; FOURNET, B. Structural characterization of a novel class of glycoposphosphingolipids from the protozoan *Leptomonas samueli*. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 34, p. 24279-24286, 1992.

PREVIATO, J. O.; WAIT, R.; JONES, C.; DOS-REIS, G. A.; TODESCHINI, A. R.; HEISE, N.; PREVIATO, L. M. Glycoinositolphospholipid from *Trypanosoma cruzi*: structure, biosynthesis and immunobiology. **Adv. Parasitol.**, v. 56, n. 1-41, 2004.

REDMAN, C. A., SCHNEIDER, P., MEHLERT, A.; FERGUSON, M. A. J. The glycoinositolphospholipids of *Phytomonas*. **Biochem. J.**, v. 311, p. 495-503, 1995.

ROMERO, G. A.; DE LA GLÓRIA, O. O. M.; DE FARIAS, G. M.; PAES, M. G.; DE OLIVEIRA, M. V.; DE CARVALHO, E. M. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. **Acta. Trop.**, v. 93, n. 1, p. 49-56, 2005.

ROTHER, R. P.; SQUINTO, S. P. The alpha-galactosyl epitope: a sugar coating that makes viruses and cells unpalatable. **Cell**, v.86, n. 2, p. 185-186, 1996.

ROUTIER, F.; PREVIATO, J. O.; JONES, C.; WAIT, R.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Glycosylinositolphospholipids from members of the Trypanosomatidae family: Investigation in the lipid moiety. **Ci. Cult. J. Braz. Assoc. Adv. Sci.**, n. 45, p. 60-68, 1993.

ROUTIER, F. H., DA SILVEIRA, E. X., WAIT, R., JONES, C., PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Chemical characterisation of glycosylinositolphospholipids of *Herpetomonas samuelpessoai*. **Molec. Biochem. Parasitol.**, v. 69, n.1, p.81-92, 1995.

SAHA, S.; MONDAL S.; BANERJEE A.; GHOSE J.; BHOWMICK, S.; ALI N. Immune responses in kala-azar. **Indian. J. Med. Res.**, v. 123, n. 3, p. 245-266, 2006.

SALDAÑA, A.; SOUSA, O. E. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. **J. Parasitol.**, v. 82, n. 2, p. 363-366.

SANTOS, A. L. S.; BRANQUINHA, M. H, D'AVILA-LEVY, C. M. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 78, n. 4, p. 687-714, 2006.

SANTOS, A. L. S., ABREU, C. M.; ALVINO, C. S.; SOARES, R. M. Activation of the glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteinases upon release from *Herpetomonas samuelpessoai* by phospholipase C. **Curr. Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 293-298, 2002.

SANTOS, A. L. S.; ABREU, C. M.; ALVINO, C. S. A.; SOARES, R. M. A. Use of proteolytic enzymes as an additional tool for trypanosomatid identification. **Parasitology**, v. 130, n. 1, p. 79-88, 2005.

SANTOS, D. O.; BOURGUIGNON, S. C.; CASTRO, H. C.; SILVA, J. S.; FRANCO, L. S.; HESPANHOL, R.; SOARES, M. J.; CORTE-REAL, S. Infection of mouse dermal fibroblasts by the monoxenous trypanosomatid protozoa *Crithidia deanei* and *Herpetomonas roitmani*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 51, n. 5, p. 570-574, 2004.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SCHNEIDER, P.; GLASSER, T. A. Characterization of a surface metalloprotease from *Herpetomonas samuelpessoai* and comparison with *Leishmania major* promastigote surface protease. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 58, n. 2, p. 277-282, 1993.

SCHNEIDER, P.; TREUMANN, A.; MILNE, K. G.; MCCONVILLE, M. J.; ZITZMANN, N.; FERGUSON, M. A. Structural studies on a lipoarabinogalactan of *Crithidia fasciculata*. **Biochem. J.**, v. 313, p. 963-971, 1996.

SHREFFLER, W. G.; BURNS, J. M.; BADARÓ, R.; GHALIB, H. W.; BUTTON, L. L.; MCMASTER, W. R.; REED, S. G. Antibody responses of visceral leishmaniasis patients to gp63, a major surface glycoprotein of *Leishmania* species., **J. Infect. Dis.**, v. 167, n. 2, p. 426-430, 1993.

SIMPSON, A. G.; LUKES, J.; ROGER, A. J. The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. **Mol. Biol. Evol.**, v. 19, n. 12, p. 2071-2083, 2002.

SLATER, N. G.; CAMERON, J. S.; LESSOF, M. H. The *Crithidia luciliae* kinetoplast immunofluorescence test in systemic lupus erythematosus. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 25, n. 3, p. 480-496, 1976.

SOUZA, M. C. M. ; ROITMAN, I. Protective effect of *Leptomonas pessoai* against the infection of mice by *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 187-189, 1971.

SOUZA, M. C. M.; REIS, A. P.; SILVA, W. D.; BRENER, Z. Mechanism of acquired immunity induced by "*Leptomonas pessoai*" against *Trypanosoma cruzi* in mice. **J. Protozool.**, n. 4, p. 579-584, 1974.

SOUZA, M. S.; MIZUTA, K.; IKEMOTO, H. In vitro exoantigen from *Herpetomonas samuelpessoai* which protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 22, n. 4, p. 184-191, 1980.

TASANOR, O.; ENGELMEIER, D.; BREM, B.; WIEDERMANN-SCHIDT, U.; GREGER, H.; WERNSDORFER, W. H. Development of a pharmacodynamic screening model with *Crithidia fasciculata*. **Wien. Klin. Wochenschr.**, n. 118, p. 42-49, 2006.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania parasites*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 46, p. 65-94, 1992.

TURCO, S. J.; SPATH, G. F.; BEVERLEY, S. M. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania*. **Trends Parasitol.**, v. 17, n. 5, p. 223-226, 2001.

UMEZAWA, E.S.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; STOLF, A.M.S. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-*T.cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas' disease. **J. Clin. Lab. Anal.**, n. 10, p. 407-413, 1996a.

UMEZAWA, E. S.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; GRUBER, A.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* defined antigens in the serological evaluation of an outbreak of acute Chagas disease in Brazil (Catolé do Rocha, Paraíba). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 91, n. 1, p. 87-93, 1996b.

VATTUONE, N. H.; YANOVSKY, J. F. *Trypanosoma cruzi*: agglutination activity of enzyme-treated epimastigotes. **Exp. Paras.**, v. 30, n. 3, p. 349-355, 1971.

VERMELHO, A. B.; ALMEIDA, F. V. S.; BRONZATO, L. S.; BRANQUINHA, M. H. Extracellular metalloproteinases in *Phytomonas serpens*. **Can. J. Microbiol.**, v. 49, n. 3, p. 221-224, 2003.

VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 28, p. 177-185, 1996.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **Int. J. Parasitol.**, v. 24, n. 8, p. 1317-1331, 1994.

WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Exp. Parasitol.**, v. 18, n. 1, p. 124-193, 1966.

ZHANG, K.; BARRON, T.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. The LPG1 gene family of *Leishmania major*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.136, n. 1, p. 11-23, 2004.