NORIVAL KESPER JUNIOR

Caracterização antigênica de moléculas de *Leptomonas seymouri* reativas com anticorpos anti *Leishmania* spp e anti *T. cruzi*.

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.

Orientador: Profa. Dra. Eufrosina Setsu Umezawa

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Kesper Junior, Norival

Caracterização antigênica de moléculas de *Leptomonas seymouri* reativas com anticorpos anti *Leishmania* spp. e anti *T. cruzi* / Norival Kesper Júnior. – São Paulo, 2012.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientadora: Eufrosina Setsu Umezawa

Descritores: 1. REATIVIDADE CRUZADA. 2. *TRYPANOSOMA CRUZI*. 3. *LEISHMANIA CHAGASI*. 4. TRIPANOSOMATÍDEOS. 5. ANTÍGENOS EXCRETADOS SECRETADOS. 6. *LEPTOMONAS SEYMOURI*.

USP/IMTSP/BIB-12/2012.

Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Candidato: **Norival Kesper Junior**

Titulo da Dissertação: “Caracterização antigênica de moléculas de *Leptomonas seymori* reativas com anticorpos anti *Leishmania* spp e anti *T. cruzi*”

Orientador: **Prof. Dra. Eufrosina Setsu Umezawa**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada em/...../....., considerou

() APROVADO(A) () REPROVADO(A)

Examinador(a)

Assinatura

Nome.....

Instituição

Examinador(b)

Assinatura.....

Nome

Instituição

Examinador(c)

Assinatura.....

Nome

Instituição

Examinador(d)

Assinatura.....

Nome

Instituição

Presidente

Assinatura

Nome.....

Instituição.....

Agradecimentos

À Prof. Dra. Eufrosina Setsu Umezawa, pela confiança nesses quase 20 anos de convívio. Por ter me ensinado quase tudo que sei, e dado as oportunidades profissionais que me impulsionaram a chegar até aqui. Por ter sido um exemplo de profissional competente, correto, austero, com quem tenho orgulho de trabalhar.

À Prof. Dra. Marta Maria Geraldês Teixeira, do laboratório de Taxonomia de Tripanosomatídeos do departamento de Parasitologia do ICB-USP, por ter cedido amostras de tripanosomatídeos de insetos. Agradeço também por ter sempre me recebido de forma tão gentil e atenciosa no laboratório que chefia, desde quando desenvolvi minha dissertação de mestrado.

À Prof. Dra. Clara Lúcia Barbieri Mestriner, do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP, pela doação das amostras de soro de pacientes com Leishmaniose visceral, pela paciência e gentileza com que me recebeu no laboratório que chefia, por ter compartilhado seu extenso conhecimento e disponibilizando protocolos que foram importantes no desenvolvimento dessa tese.

À Prof. Dr. Ângelo Lauletta Lindoso, do hospital Emílio Ribas e do laboratório de soroepidemiologia do IMT, por ter cedido as amostras de soros de pacientes com Leishmaniose tegumentar, pela simpatia e total disposição em auxiliar sempre que precisei. Agradeço também pelas sugestões dadas quando membro da banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior, chefe do laboratório de Protozoologia-LIM49, eclético, pessoa de inteligência brilhante e capacidade enorme, mas sem dúvida de um coração gigante. Agradeço pela sua sempre disponibilidade e inestimável auxílio, não só quando precisei, mas como pude constatar, quando muitos precisaram.

À Marilda Savoia Nascimento, com quem tenho uma dívida de gratidão desde meu mestrado. Pessoa agradável e alegre (não me lembro de te-la visto de mau-humor), ótima companheira de trabalho. Agradeço pelas dicas e auxílio na correção dessa tese. Agradeço também pelas conversas diárias, pelas risadas, enfim pela convivência de quase 20 anos baseada no respeito e companheirismo.

À Viviana Vanessa Pinedo Cancino, pessoa alegre e extrovertida que me proporcionou muitos momentos de descontração e outros de muito trabalho. Agradeço pelas discussões quase diárias que engrandeceram nossos trabalhos paralelos, porém com muito em comum. Agradeço também pelas dicas e auxílio na correção dessa tese.

À Mônica de Paula Leal, técnica de muita capacidade, sempre prestativa, quem me auxiliou em parte da metodologia dessa tese e na parte técnica geral do laboratório, me deixando mais livre para que pudesse desenvolver esse trabalho.

Ao Leandro Ferreira Rodrigues, pelas sugestões, ajuda com a formatação de gráficos e figuras, pela convivência agradável e disponibilidade de auxílio nos momentos que mais precisei, a quem considero um amigo.

Ao Luciano Monteiro da Silva, quem nunca me negou se quer um pedido de auxílio, desde que começamos a trabalhar juntos, há seguramente mais de 12 anos. Agradeço pela sua competência em resolver todos problemas relacionado com a parte burocrática do laboratório e outros mais, o que sem dúvida refletiu em mais tempo para desenvolver minha tese.

Ao Luiz Felipe Domingos Passero, pesquisador do laboratório de Patologia das leishmanioses, pelo seu ato de amizade e solidariedade se disponibilizando à ler toda a minha tese e deste modo contribuindo com correções e sugestões pertinentes, que sem dúvida engrandeceram meu trabalho.

À Dra. Rosely dos Santos Mallafronte, por dispor de seu tempo para auxiliar na correção de parte dessa tese. A quem também agradeço pela agradável convivência, amabilidade e sinceridade, durante esses anos de convivência.

À Almir Robson Ferreira, Maria Iranildes de Oliveira e Elita Rodrigues de Jesus pelo auxílio com parte da documentação desta tese. Pessoas de grande capacidade técnica que sempre se dispuseram a auxiliar-me em todos os momentos que precisei.

À Sônia Gomes Pedroso, bibliotecária dedicada e competente, pelos seus ensinamentos e por perder muito de seu tempo corrigindo as referências bibliográficas dessa tese.

À todos os colegas do laboratório de Protozoologia, Andrés, Rose, Lícia, Isabel, que direta ou indiretamente me auxiliaram de alguma forma com dicas, palavras de conforto e incentivo.

RESUMO

Kesper N.- Caracterização antigênica de moléculas de *Leptomonas seymouri* reativas com anticorpos anti *T. cruzi* e anti *Leishmania* sp (tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2012.

Parasitas da família trypanosomatidae como dos generos *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Hepertomonas* e *Rhynchoidomona* infectam insetos e *Phytomonas* parasitam plantas. O *T. cruzi* e *L. (L.) chagasi*, agentes etiológicos respectivamente da doença de Chagas e da leishmaniose visceral (LV) também fazem parte desta família. Pela similaridade entre estes parasitos alguns estudos tem utilizado os tripanosomatídeos não patogênicos como fonte alternativa de antígenos para o imunodiagnóstico da doença de Chagas e da leishmaniose. Com o objetivo de identificar moléculas em tripanosomatídeos não patogênicos que reagem com anticorpos anti *T. cruzi* e anti- *Leishmania* sp, foram utilizados dois preparados antigênicos: a fração excretada-secretada (ES) e o extrato total obtido por digestão química (ET) de *L. seymouri*, *C. deanei*, *C. fasciculata* e *C. lucilliae*, sempre comparados com o *T. cruzi* e a *L. (L.) chagasi*. A reatividade diferencial entre anticorpos anti *T. cruzi* e anti *L. (L.) chagasi* levou à escolha da *L. seymouri*, único parasito no qual a fração ES mostrou significativas diferenças de reatividade, a *C. deanei* apresentou dados semelhantes. Anticorpos presentes em casos de LV reagem, por ELISA, tanto com ES como com ET de *L. seymouri*, no entanto casos de leishmaniose tegumentar e a maioria dos chagásicos não apresentaram reação com a fração ES deste parasito, apesar de reagirem com o antígeno ET. O ELISA mostrou que os anticorpos anti *L. (L.) chagasi* reagem mais com proteínas contidas no ES e menos com carboidrato, ao contrário a baixa reatividade dos anticorpos anti *T. cruzi* para o ES são preferencialmente contra carboidratos. Quando as frações de ES e ET foram analisados por Immunoblotting o anti- *L. (L.) chagasi* não reagiu com nenhuma banda por esta metodologia, ao contrário anticorpos anti- *T. cruzi* apresentaram intensa reação com bandas na região de 29-36kDa do ET de *L. seymouri*, que foram identificadas como sendo moléculas de proteínas e de carboidratos (66-97kDa) para o ES. A utilização de soros policlonais monoespecíficos mostra que ES e ET possuem epítomos compartilhados e a quantificação deste compartilhando foi calculado utilizando anticorpos monoespecíficos eluídos de ES ou ET. Estes resultados mostraram que a identificação de moléculas reativas de *L. seymouri* por anticorpos presentes em chagásicos e leishmanióticos sp depende da metodologia empregada versus preparado antigênico. A superioridade das moléculas contidas no parasito de *L. seymouri* foi adicionalmente evidenciada quando 25,5% das amostras de soros de VL que apresentavam baixa reatividade para o ET de *L. chagasi*, Abs_{492nm} menores que 0,99 e média e SD de $0,56 \pm 0,18$ apresentavam alta reatividade para o ET de *L. seymouri* ($p < 0,01$) com média e SD de $1,51 \pm 0,35$. Estes dados nos indicam que uma caracterização mais profunda das moléculas presentes na *L. seymouri* é de vital importância se for empregada no imunodiagnóstico das doenças de Chagas e leishmaniose.

Descritores: *T. cruzi*, *Leishmania (L.) chagasi*, *Leptomonas seymouri*, antígenos excretados-secretados, imunorreatividade cruzada.

ABSTRACT

Kesper N.- Antigenic characterization of *Leptomonas seymouri* molecules reactive with anti- *T. cruzi* and anti- *Leishmania* antibodies (PhD thesis). Institute of São Paulo Tropical Medicine of São Paulo University; 2012.

Parasites of Trypanosomatidae family as *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Hepertomonas* and *Rhynchoidomonas* infect insects and *Phytomonas* parasitize plants. *T. cruzi* and *L. (L.) chagasi* the etiological agents of Chagas disease and Leishmaniasis (VL) respectively, belong to this family. The similarity between these parasites led few studies to use non-pathogenic trypanosomatids as an alternative source of antigens for Chagas' disease and leishmaniasis immunodiagnosis. With the aim of identifying molecules in nonpathogenic trypanosomatids that react with anti *T. cruzi* and anti-*Leishmania* antibodies, two antigenic preparations were employed: the excreted-secreted molecules (ES) and total extract obtained by chemical digestion (ET) of *L. seymouri*, *C. deanei*, *C. fasciculata* and *C. luciliae*, and compared with *T. cruzi* and a *L. (L.) chagasi*. ES fraction of *L. seymouri* was the unique that showed differences in reactivity when tested with anti *T. cruzi* and anti *L. (L.) chagasi* antibodies, evaluation with *C. deanei* showed similar data. ELISA performed with *L. seymouri* ES and ET antigens reacted with all VL cases, however tegumentar leishmaniasis and Chagas disease cases showed no reaction with the ES fraction, although they react with ET antigen. The ELISA revealed that anti *L. (L.) chagasi* antibodies react with proteins contained in ES and less with carbohydrate, unlike the low reactivity of anti *T. cruzi* with ES were mainly against carbohydrates. When ES and ET were analyzed by immunoblotting the anti *L. (L.) chagasi* antibodies did not react with any bands, unlike antibodies to *T. cruzi* showed intense reaction with 29-36kDa protein bands of *L. seymouri* ET and carbohydrate bands ES (66-97kDa). The use of monospecific polyclonal sera showed that ES and ET share epitopes and these data was calculated using monospecific antibodies eluted from ES or ET antigens. These results show that the identification of *L. seymouri* molecules reactive by chagasic and leishmaniotic sp cases depends on the methodology employed versus antigenic preparation. The superiority of *L. seymouri* reactivity was further evidenced when 25.5% of VL sera that showed low reactivity to *L. chagasi* ET (Abs 492nm < 0.99 and smaller than average and SD of 0.56 +/- 0.18) showed high reactivity to ET *L. seymouri* (p <0.01) with mean and SD of 1.51 +/- 0.35. These data indicate that a more thorough characterization of molecules present in *L. seymouri* is of vital importance if used in Chagas disease and leishmaniasis immunodiagnosis.

Descriptors: *T. cruzi*, *Leishmania (L.) chagasi*, *Leptomonas seymouri*, excreted-secreted antigens, cross-reaction.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Os Tripanosomatídeos	15
1.2	Moléculas de superfície em Tripanosomatídeos	18
1.2.1	Proteases	18
1.2.2	Glicoconjugados	21
1.3	Imunorreatividade cruzada entre Tripanosomatídeos.....	26
2	OBJETIVOS	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Parasitas	31
3.1.1	Cultivo de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	31
3.1.2	Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
3.1.3	Cultivo dos “tripanosomatídeos não patogênicos” <i>Crithidia deanei</i> e <i>Leptomonas seymouri</i>	32
3.2	Obtenção dos preparados antigênicos	32
3.2.1	Obtenção do extrato antigênico total (ET).....	32
3.2.2	Obtenção de moléculas excretadas-secretadas (ES) de <i>L. (L.) chagasi</i> , <i>L. seymouri</i> e <i>C. deanei</i>	33
3.2.3	Obtenção das moléculas excretadas-secretadas de formas tripomastigotas do <i>Trypanosoma cruzi</i> (TESA = Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens)	33
3.4	Dosagem protéica dos extratos antigênicos	34
3.5	Amostragem de soros, anticorpos monoclonais, policlonais monoespecíficos e eluatos.....	34
3.5.1	Soros	34
3.5.2	Anticorpos monoclonais e policlonais monoespecíficos	35
3.6	ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay).....	37
3.6.1	Oxidação dos epitopos de carboidratos com metaperiodato de sódio (NaIO ₄)	38
3.6.2	Tratamento químico do antígeno com proteinase K.....	38
3.7	Eletroforese de proteínas em gel de poliácridamida	39
3.7.1	Transferência eletroforética de proteínas.....	40
3.7.2	Immunoblotting	40
3.7.3	Análise por Immunoblotting após tratamento com metaperiodato de sódio (NaIO ₄).....	41
3.7.4	Concentração das amostras de ES de <i>L. seymouri</i>	42
3.7.5	Atividade proteolítica detectada em gel contendo gelatina.....	42
3.8	Análise dos dados	43

4	RESULTADOS.....	44
4.1	Critério de escolha dos tripanosomatídeos.	44
4.2	Moléculas excretadas-secretadas por <i>L. seymouri</i>	46
4.3	Enzyme-immunosorbent-assay (ELISA).....	48
4.3.1	Dos antígenos	48
4.3.2	Do limiar de reatividade	49
4.3.3	Reatividade dos antígenos ES e ET de <i>L. seymouri</i> e <i>C. deanei</i> ...	49
4.3.4	Casos de leishmaniose visceral (LV)	50
4.3.5	Casos de Leishmaniose Tegumentar.....	54
4.3.6	Casos de doença de Chagas.....	56
4.3.7	Casos com outras doenças	59
4.4	Análise das moléculas liberadas por <i>L. seymouri</i>	61
4.5	Imunoreatividade dos antígenos ES-ET de <i>L. seymouri</i> por Immunoblotting	62
4.6	Caracterização da imunoreatividade das moléculas ES e ET de <i>L.</i> <i>seymouri</i>	66
4.7	Identificação de epitopos imunogênicos por anticopos monoclonais e policlonais monoespecíficos	73
4.8	Avaliação imunodiagnóstica por Immunoblotting dos antígenos de <i>L. seymouri</i>	74
5	DISCUSSÃO	77
6	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS	95
	ANEXOS.....	106

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Análise da reatividade de casos chagásicos ($n=10$, CH) pelo ELISA-ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *C. fasciculata*, *C. lucilae*, e *L. (L.) chagasi* e ET de *T. cruzi*. As barras horizontais representam as médias aritméticas de reatividade para cada antígeno ($\Sigma \text{ Abs}_{492\text{nm}}$).....45
- Figura 2 -** Análise da reatividade ($\text{Abs}_{492\text{nm}}$) dos soros de pacientes com LV, CH e indivíduo saudável (normal) por ELISA com ES de *L. seymouri* obtidos após 1h, 3h, 6h, 12h, 24h e 48h de incubação ...46
- Figura 3 -** Análise da reatividade ($\text{Abs}_{492\text{nm}}$) dos soros de pacientes com LV1, LV2, CH e de indivíduo saudável (normal) com ELISA- ES de *L. seymouri* obtido após 24 horas de incubação em meios LIT ou RPMI.....47
- Figura 4 -** Distribuição da reatividade ($\text{Abs}_{492\text{nm}}$) dos soros de indivíduos saudáveis ($n=20$) por ELISA-ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*. As barras horizontais representam as médias aritméticas de reatividade para cada antígeno ($\Sigma \text{ Abs}_{492\text{nm}}$). LR = limiar de reatividade.....49
- Figura 5 -** Distribuição da reatividade ($\text{Abs}_{492\text{nm}}$) de amostras de soros de pacientes com LV ($n=51$), por ELISA-ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*. As barras horizontais representam as médias aritméticas de reatividade ($\Sigma \text{ Abs}_{492\text{nm}}$) para cada antígeno50
- Figura 6 -** Distribuição da reatividade dos soros de pacientes com LV ($n=51$) por ELISA-ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*. (A) soros de LV com reatividade $>1,00$ ($n=38$) e (B) soros de LV com reatividade $< 0,99$ ($n=13$) para ELISA-ET de *L.(L.) chagasi*. As barras horizontais representam as médias aritméticas de reatividade ($\Sigma \text{ Abs}_{492\text{nm}}$) para cada antígeno.....53
- Figura 7 -** Distribuição da reatividade dos soros de pacientes com LT ($n=23$) por ELISA-ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*. As barras horizontais representam as médias aritméticas de reatividade ($\Sigma \text{ Abs}_{492\text{nm}}$) para cada antígeno.....55
- Figura 8 -** Distribuição da reatividade dos soros de pacientes com CH ($n=23$) por ELISA-ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*. As barras horizontais representam as médias aritméticas de reatividade ($\Sigma \text{ Abs}_{492\text{nm}}$) para cada antígeno.....57
- Figura 9 -** Distribuição da reatividade dos soros de pacientes portadores de outras doenças ($n=26$), por ELISA-ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*. As barras horizontais representam a média aritmética ($\Sigma \text{ Abs}_{492\text{nm}}$) para cada antígeno59

- Figura 10** - Detecção de proteases no ES de *L. seymouri* por SDS-PAGE em condições não denaturante (linhas 2, 4) e denaturante (linhas 3, 5) e ES 40x concentrado (linhas 4, 5), corado com Comassie Blue. PM= Peso molecular (linha 1)61
- Figura 11** - Análise por Immunoblotting da reatividade de soros de pacientes de CH e LV com ES de *L. seymouri* obtido em meio de cultura LIT (1) e meio RPM (2), incubados com soro de CH (A) e LV (B). À esquerda das figuras estão indicados os pesos moleculares (kDa)....62
- Figura 12** - ES-blot de *L. seymouri* com ES preparado em condições denaturante (A, B) e não denaturante (A', B') e reatividade com soros de CH (A, A', linhas 1 a 3) e de LV (B, B', linhas 1 a 3). Os marcadores de PM (kDa) estão indicados à esquerda das figuras63
- Figura 13** - Análise por immunoblotting de *L. seymouri* preparado com lisado de 5×10^8 parasitas (1); ES obtido após 24 de incubação em meio RPMI (2); ES obtido após 48 horas de incubação em meio RPMI (3), e incubados com soro de CH (A); LV (B) e monoclonal anti-alfatubulina (C). Os marcadores de PM (kDa) estão indicados à esquerda das figuras.....65
- Figura 14** - Análise por immunoblotting de *L. seymouri*: lisado de 5×10^8 parasitas (1); antígeno ET (2), incubados com soro LV (A), e CH (B). Os marcadores de PM (kDa) estão indicados à esquerda das figuras65
- Figura 15** - Reatividade (Abs_{492nm}) de 3 soros de LV (A) e 3 de CH (B) por ELISA com antígenos ES de *L. seymouri* tratados ou não com proteinase K (2ug/ml de PK) e metaperiodato de sódio (20mM, NaIO₄). A tabela abaixo da figura apresenta a porcentagem de queda da reatividade dos antígenos.....67
- Figura 16** - Reatividade (Abs_{492nm}) de 3 soros de LV (A) e 3 de CH (B) por ELISA com antígeno ET de *L. seymouri*, tratados ou não com proteinase K (2ug/ml de PK) e metaperiodato de sódio (20mM, NaIO₄). A tabela abaixo da figura apresenta a porcentagem de queda da reatividade.....68
- Figura 17** - Reatividade por Immunoblotting de soros de CH com ES (A) e ET (B) de *L. seymouri* tratados com metaperiodato de sódio (20 mM - linhas 1', 2', 3') e controle sem tratamento (linhas 1, 2, 3). Os marcadores de PM (kDa) estão indicados à esquerda das figuras69
- Figura 18** - Análise por ELISA (abs 492nm) da reatividade de ES e ET de *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi*, com anticorpos policlonais de LV eluídos de (A)- ET de *L. seymouri*; (B)- ES de *L. seymouri* e (C)- ES de *L. (L.) chagasi*. A linha pontilhada representa o limiar de reatividade. Os números acima das barras representam a porcentagem de reatividade71

- Figura 19** - Análise por ELISA (abs 492nm) da reatividade de ES de *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi*, com soro de LV absorvido (30 min.- 37°C) com A- ES de *L. seymouri* e B- ES de *L. (L.) chagasi*. A linha pontilhada representa o limiar de reatividade. A tabela abaixo representa as porcentagens de absorção e reatividade72
- Figura 20** - Análise por ELISA da reatividade dos antígenos ES e ET de *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi* com anticorpo monoclonal anti- α -tubulina; soros policlonais monoespecíficos- anti- *L. seymouri*, anti- *L. (L.) amazonensis*, anti-LPPG, e monoclonal anti- SSP4. A linha pontilhada representa o limiar de reatividade.....74
- Figura 21** - Comparação da reatividade por immunoblotting de (1) parasita lisado; (2) ET e (3) ES de *L. seymouri* incubados com soro (A) LV; (B) CH; (C) LT e (D) soro de indivíduo sadio. Os marcadores de PM (kDa) estão indicados à esquerda das figuras75
- Figura 22** - Análise da reatividade, por imunoblotting, de antígeno ET de *L. seymouri* com soros de: (A) CH, 1 a 10; (B) LV , 1 a 7; (C) LT, 1 a 4; (D) toxoplasmose, 1; (D) indivíduo saudável, 2. Os marcadores de PM (kDa) estão indicados à esquerda das figuras76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações protéicas ($\mu\text{g/ml}$) ou diluições (10^{-1}) dos antígenos ES e ET de <i>L. seymouri</i> , <i>C. deanei</i> , <i>L. (L.) chagasi</i> e <i>T. cruzi</i> , utilizadas no ELISA	48
Tabela 2 - Número, porcentagem de casos positivos (n , %) e média aritmética ($\sum \text{Abs}_{492\text{nm}}$ + SD) da reatividade dos casos de leishmaniose visceral ($n=51$) avaliados pelo ELISA- ES e ET de <i>L. seymouri</i> , <i>C. deanei</i> , <i>L.(L.) chagasi</i> e <i>T. cruzi</i>	51
Tabela 3 - Positividade e $\sum \text{Abs}_{492\text{nm}}$ +/-SD dos vários antígenos com soros de pacientes com LV ($n=51$) classificados em dois grupos de acordo com sua reatividade para o ELISA-ET de <i>L. (L.) chagasi</i> em $\text{Abs}_{492\text{nm}} > 1,00$ e $\text{Abs}_{492\text{nm}} < 0,99$	54
Tabela 4 - Número, porcentagem de positivos (n , %) e média aritmética ($\sum \text{Abs}_{492\text{nm}}$ + SD) da reatividade dos casos de leishmaniose tegumentar ($n=23$) avaliados por ELISA- ES e ET de <i>L. seymouri</i> , <i>C. deanei</i> , <i>L.(L.) chagasi</i> e <i>T. cruzi</i>	56
Tabela 5 - Número porcentagem de positivos (n , %) e média aritmética ($\sum \text{Abs}_{492\text{nm}}$ + SD) dos casos de doença de Chagas ($n=19$) avaliados por ELISA-ES e ET de <i>L. seymouri</i> , <i>C. deanei</i> , <i>L. (L.) chagasi</i> e <i>T. cruzi</i>	58
Tabela 6 - Número, porcentagem de casos positivos (n , %) e média aritmética ($\sum \text{Abs}_{492\text{nm}}$ + SD) da análise dos diferentes grupos de soros (LV, LT, CH, OD e S) com antígenos ES e ET de <i>L. seymouri</i> , <i>C. deanei</i> , <i>L. (L.) chagasi</i> e <i>T. cruzi</i>	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os Tripanosomatídeos

A família Trypanosomatidae da ordem Kinetoplastidae é formada por um grupo cosmopolita de protozoários flagelados que apresentam parasitos com capacidade de infectar organismos eucariontes como animais, plantas e protistas (Wallace, 1966; McGhee e Cosgrove, 1980; Vickerman, 1994). Os tripanosomatídeos diferenciam-se de outros protozoários devido a características únicas como: mecanismo de variação antigênica, “trans-splicing”, edição de RNA, organização nuclear peculiar e mitocôndria única, o cinetoplasto, localizado próximo ao corpo basal flagelar e rico em DNA mitocondrial (kDNA) constituído de max e mini círculos (Simpson, 2002; McGhee e Cosgrove, 1980; Santos et al., 2006). Apresentam uma rede de microtúbulos subpeliculares bastante rígida, conferindo a estes protozoários formas celulares bem definidas durante seu ciclo evolutivo (Chang e Fong, 1986). As características morfológicas dos gêneros que compõem a família são homogêneas, sendo que todas as espécies desta família são parasitos. Esses organismos são capazes de adaptar facilmente seu metabolismo à disponibilidade de substratos e oxigênio do meio, tendo desta forma competência para o parasitismo em diferentes hospedeiros (McGhee e Cosgrove, 1980; Vickerman, 1994). Durante sua longa história evolutiva parecem ter desenvolvido uma impressionante capacidade de adaptação ao parasitismo, tanto os monoxenos, envolvendo um único hospedeiro, como os heteroxenos, alternando entre invertebrado e vertebrado ou plantas (Dollet, 1984; McGhee e Cosgrove, 1980). Desta forma os tripanosomatídeos podem parasitar com eficiência um amplo número de

hospedeiros, como fazem os de importância médica compreendendo as espécies já bem conhecidas, *T. brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* sp, que são responsáveis por um amplo espectro de doenças em animais e humanos, tais como a doença do sono, doença de Chagas e Leishmanioses, que acometem milhões de indivíduos ao redor do globo (Vickerman, 1994). Parasitos do gênero *Endotrypanum* compreendem os únicos intraeritrocíticos encontrados exclusivamente em bicho-preguiça (Cupollilo et al., 2000). Já aqueles do gênero *Phytomonas* causam doenças em frutas e plantas de grande interesse econômico e são transmitidos à seus hospedeiros por insetos hemípteros fitófagos (Camargo, 1999; Breganó et al., 2003). Outros como os dos gêneros *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, parasitam principalmente artrópodos de diferentes táxons, podendo também ser encontrados em organismos como nematóides, moluscos e anelídeos (McGhee e Cosgrove, 1980; Vickerman, 1994; Wallace, 1966).

Os tripanosomatídeos de plantas como *Phytomonas* e de gêneros monoxenos como *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* foram denominados informalmente como “tripanosomatídeos inferiores” com base em aspectos morfológicos e de ciclo de vida que considera espécies desses gêneros como as mais primitivas dentre a família. Porém, a partir de dados moleculares, este conceito vem sendo revisto por alguns pesquisadores (Vickerman, 1994).

Os “tripanosomatídeos inferiores” são facilmente cultivados em condições axênicas e não produzem patologias em humanos (McGhee e Cosgrove, 1980; Vickerman, 1994; Podlipaev, 2000). Todavia relatos de infecções desses tripanosomatídeos em invertebrados foram primeiramente evidenciadas especificamente com parasitos do gênero *Crithidia* em embriões de aves por McGhee (1959). Mais tarde, Dagget et al. (1972) obteve evidências da infecção de lagartos e camundongos com *Herpetomonas megalasie*. Os primeiros relatos de infecções em seres humanos ocorreram em 1980, com um possível caso de

infecção por *Herpetomonas* em uma mulher que vivia no Texas (McGhee e Cosgroove, 1980). Mais recentemente, atribui-se a tripanosomatídeos monoxênicos quadro clínicos similares à leishmaniose difusa em pacientes infectados por HIV (Chicarro e Alvar, 2003). De fato foi demonstrado co-infecção por *Leptomonas* sp e *L. donovani* na Índia (Ghosh et al., 2012) e *Herpetomonas* e HIV na França (Morio et al., 2008). O aparecimento dos tripanosomatídeos inferiores como oportunistas, suscita questões acerca da relevância clínica desses patógenos. De qualquer modo, pouco se sabe sobre a patobiologia desses organismos infectando seres humanos.

Conforme já citado, devido à facilidade de cultivo dos mesmos, aliada à similaridade molecular de muitos processos biológicos com os patogênicos, como por exemplo, a síntese de poliaminas (Comini et al., 2005) e metabolismo de tripanotiona (Flohé, 2012), esses tripanosomatídeos servem como modelos de estudo para o desenvolvimento de drogas anti parasitárias. Nesse sentido trabalhos pioneiros realizados nas décadas de 60 e 70 avaliaram a utilização dos mesmos como “screening” de drogas anti *Leishmania* e *T. cruzi* (Wallis, 1966; Goldberg et al., 1974). Mais recentemente, estudos vêm demonstrando o potencial desses organismos, como por exemplo, da *Crithidia fasciculata* para o desenvolvimento de drogas farmacodinâmicas (Tasanor et al., 2006).

Os tripanosomatídeos do gênero *Crithidia* também se mostram de grande utilidade ao diagnóstico de doenças auto-imunes, como no lúpus eritematoso sistêmico (Aarden et al., 1975; Slater et al., 1976; Nilsson e Biberfeld, 1980; Fisher-Smikle et al., 1987). Pacientes com lúpus produzem anticorpos detectados pela reação de imunofluorescência indireta (IFI), que reagem com histonas e DNA complexado de *C. luciliae* (Aarden et al., 1975; Slater et al., 1976) já que este organismo assim como outros tripanosomatídeos, possui um cinetoplasto formado

por um condensamento de DNA, formado por mini e maxi-círculos livres de proteínas associadas facilitando a reatividade com esses anticorpos.

Em suma, os tripanosomatídeos não patogênicos apesar de diretamente não apresentarem importância médica, apresentam papel relevante no contexto médico-científico como organismos modelos para estudos que visam elucidar mecanismos bioquímicos e processos moleculares comuns aos patogênicos. Todavia essa é uma área ainda muito pouco explorada, já que estimativas apontam para a existência de mais de 1.000.000 de espécies de insetos que poderiam hospedar tripanosomatídeos, porém apenas 350 foram identificadas albergando tripanosomatídeos monoxenos (Podlipaev, 2000). Deste modo a vasta maioria de tripanosomatídeos de insetos e sua relação com a família necessitam ainda serem descritas.

1.2 Moléculas de Superfície em Tripanosomatídeos

1.2.1 Proteases

A similaridade dos processos celulares entre flagelados de plantas e insetos com os tripanosomatídeos de mamíferos, agentes etiológicos de importantes doenças, sempre foi um fato intrigante que tem despertado grande interesse de pesquisadores ao longo dos anos (McGhee e Cosgroove, 1980; Vickerman, 1994; Podlipaev, 2000). É consensual no meio científico a importância da realização de estudos e melhor entendimento da biologia dos tripanosomatídeos não patogênicos. Esses organismos podem contribuir sobremaneira para um maior conhecimento de modelos de nutrição, bioquímica, quimioterapia e biologia molecular nos tripanosomatídeos patogênicos. Realmente, a similaridade existente

entre esses organismos começou a ser apresentada em diversos estudos que se iniciaram na década de sessenta e ocorrem até os dias atuais. Nesse sentido, trabalhos pioneiros demonstraram, por exemplo, que tripanosomatídeos de insetos são capazes de infectar células de mamíferos (Wallace, 1966; McGhee e Cosgroove, 1980). Outro estudo mostrou ainda que a glândula odorífera de *Opossum* sp suporta o crescimento desses tripanosomatídeos por no mínimo seis meses (Jansen et al., 1988). Nessa mesma linha 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).

Um dos aspectos que pode refletir essa capacidade de infecção de células de mamíferos por tripanosomatídeos não patogênicos está sem dúvida no repertório molecular que os mesmos apresentam. Alguns estudos têm demonstrado que esses tripanosomatídeos apresentam moléculas antigênicas comuns a outros gêneros patogênicos (Souza et al., 1974, 1980; Lopes et al., 1981; Breganó et al., 2003; Santos et al., 2006). Dentre essas moléculas, uma das mais estudadas são as proteases. É amplamente conhecido que tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, assim como o *Trypanosoma cruzi*, apresentam enzimas proteolíticas ou proteases na superfície de suas membranas, como as já bem caracterizadas metaloproteases de 63 kDa (gp63) de leishmânias (Etges et al., 1986; Medina-Acosta, Beverley e Russell, 1993) e cisteíno proteases (cruzipaína) de *T. cruzi* (Cazulo et al., 1989). As proteases são moléculas que apresentam relevante papel na relação hospedeiro parasito sendo implicada 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).

Trabalho pioneiro foi o realizado por Etges (1992) que demonstrou em tripanosomatídeos dos gêneros *Crithidia* e *Herpetomonas* a presença de metaloproteases de superfície com propriedades bioquímicas similares a GP63 de

leishmânias. Desde então se especula que a GP63 poderia estar envolvida na interação parasito- hospedeiro- inseto (Etges, 1992, Santos et al., 2006).

É de conhecimento que os tripanosomatídeos patogênicos podem excretar/secretar muitas moléculas para o meio extracelular (Schmuñis et al., 1978; Mukerji et al., 1986; Luty et al., 1994). Muitas dessas estão ligadas à membrana por âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e foram caracterizadas como enzimas e antígenos (Gonçalves, 1991; Umezawa et al., 1996). Entretanto, o mecanismo de liberação e função que essa molécula desempenha continua sendo motivo de estudo. Curiosamente, o mesmo mecanismo pode ser observado nos tripanosomatídeos não patogênicos. Trabalho pioneiro mostrou que exoantígenos liberados por *Herpetomonas samuel pessoai* podiam proteger camundongos da infecção por *T. cruzi* (Souza et al., 1980). Trabalhos recentes têm mostrado que o mesmo *Herpetomonas samuel pessoai* (Dos Santos et al., 2002; Elias et al., 2006), *Crithidia lucillae* e *Leptomonas seymouri* (Jaffe e Dawyer, 2003) são capazes de liberar para o meio extracelular metaloproteases de superfície com 63 kDa. Essa metaloproteases se assemelham bioquimicamente com a GP63 de leishmânias pela sua localização na superfície celular, ligação a GPI e sensibilidade a inibidores de metaloproteases como a 1,10-phenanthroline (Schneider e Glaser, 1993). Da mesma forma foram caracterizadas metaloproteases extracelulares homólogas a GP63 de leishmânias com migração eletroforética entre 50 e 100 kDa em vários tripanosomatídeos inferiores como *Phytomonas serpens* (Vermelho et al., 2003), *Crithidia guilhermei* e *Crithidia oncopelti* (D'Avila-Levy et al., 2001), *Crithidia fasciculata* e *Crithidia lucillae* (Branquinha et al., 1996) e *Blastocrithidia culicis* (D'Avila-Levy et al., 2005) entre outros.

Vários estudos com essas metaloproteases em leishmânias demonstraram o potencial das mesmas como possíveis alvos para agentes quimioterápicos

(Chenik et al., 2006) ou na elaboração de vacinas (Beverley et al., 2005; Chenik et al., 2006).

Recentemente foram caracterizadas em *Phytomonas serpens* duas cisteíno-peptidases de 38 e 40 kDa respectivamente que compartilham características bioquímicas e imunológicas com a cruzipaina (Santos et al., 2006). Especificamente a peptidase de 40kDa foi localizada na superfície celular ligada a membrana via ancora de GPI e também no sobrenadante de cultura, sugerindo que a mesma é liberada para o meio extracelular (Elias et al., 2008). Da mesma forma, mais tarde foi demonstrado que essa molécula, presente no sobrenadante de cultivo de *P. serpens* apresentava imunorreatividade cruzada com soro de paciente com Doença de Chagas (Elias et al., 2009).

1.2.2 Glicoconjugados

Muitas das proteases, conforme já citado anteriormente, encontram-se ligadas à membrana por âncora de GPI. Os GPIs são uma família de glicolipídeos amplamente distribuída na natureza e implicados em importantes funções biológicas (Ferguson, 1997). Ocorrem de maneira mais abundante nos protozoários parasitos onde atuam na integração de glicoproteínas, glicolipídeos e fosfossacarídeos na membrana celular (Turco, 2003). Essas moléculas foram pouco estudadas nos tripanosomatídeos inferiores, porém estão bem caracterizadas em tripanosomatídeos de mamíferos (Turco, 2003), estando envolvidas em vários processos celulares como, sinalização de membrana, tráfego intracelular (Ferguson, 1999) e também na interação parasito-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) ou, em *Plasmodium falciparum*, atuando como um possível mediador de resposta inflamatória (Gowda, 2007).

Os GPIs também podem ser encontrados em protozoários parasitos formando glicolípídeos de superfície não ligados a proteínas como lipofosfoglicana (LPG) e glicosilinositolfosfolípídeos (GIPLS) principalmente no gênero *Leishmania* (Ferguson, 1997). Os GIPLS são a principal família de moléculas de glicolípídeos não ligados a proteínas e polissacarídeos sintetizados pela *Leishmania* sp e *T. cruzi* (Turco, 2003; Ferguson, 1997). São expressos em amastigotas e promastigotas de leishmania, e tripomastigota e epimastigota de *T. cruzi*, formando uma densa camada sobre a superfície das células (Ferguson, 1999).

Ainda não é muito conhecido, por exemplo, o papel desempenhado por esses glicolípídeos na interação leishmania-hospedeiro vertebrado, porém o uso de receptor de manose para ligação do parasito ao macrófago sugere que GILPs ricos em manose possam ter papel importante na invasão (Sacks e Kamhawi, 2001). Por serem os maiores constituintes da membrana de amastigotas acredita-se que desempenhem função protetora contra hostilidades do meio e na relação parasito hospedeiro vertebrado (Ilgoutz et al., 2001). Além disso, enzimas envolvidas na biosíntese de GILPs são essenciais para a virulência do parasito, enfatizando a importância dos glicolípídeos na viabilidade dos mesmos (Turco, 2003).

Em *Leishmania mexicana*, por exemplo, os GILPs apresentam-se em três tipos de acordo com sua estrutura glicídica (McConville et al., 1993). Os do tipo 1 são mais similares aos GPIs que ancoram proteínas e contém uma região central de $\text{Man}_1\text{-6Man}_1\text{-4GlcN}_1\text{-6PI}$. O tipo 2 contém $\text{Man}_1\text{-3Man}_1\text{-4GlcN}_1\text{-6PI}$, e o híbrido, $\text{Man}_1\text{-3}(\text{Man}_1\text{-6})\text{Man}_1\text{-4GlcN}_1\text{-6PI}$. A proporção relativa dos diferentes tipos varia entre as espécies de *Leishmania* e entre as formas evolutivas (McConville e Ferguson, 1993). Os GIPLS estão também presentes em outras espécies de tripanosomatídeos como *Crithidia fasciculata*, *Herpetomonas samuel*

persoai, *Leptomonas samueli* e *Endotrypanum* com estrutura semelhante aos de *Leishmania* e *T. cruzi* (Turco, 2003). Moléculas do tipo 1 foram descritas em *Phytomonas* (Redman et al., 1995) e tipo 2 e/ou híbrido em *Leptomonas samueli* (Previato et al., 1992), *Endotrypanum schaudinni* e *Herpetomonas samuel pessoai* (Routier et al., 1995) e *Crithidia fasciculata* (Schneider et al., 1996).

Todavia diferentes moléculas de lipídeos são encontradas compondo a estrutura dos GILPs de diferentes tripanosomatídeos. Foi demonstrado que espécies como *T. cruzi*, *L. samueli*, *C. lucilae*, *H. samuel pessoai* e *E. schaudinii* sintetizam fosfoesfingolipídeos, enquanto *L. alderi*, *L. tarentolae* e *P. serpens* sintetizam glicerofosfolipídeos. De fato, esses achados podem sugerir que determinadas estruturas sobre a superfície celular possam estar envolvidas na interação específica entre hospedeiro-parasito. Entretanto tais diferenças na estrutura podem não ser funcionalmente significativas e apenas refletir uma expansão do sistema enzimático para a síntese tanto de ceramida quanto glicerolipídeo (Routier et al., 1993).

Em *Leishmania*, principalmente na forma promastigota, a superfície celular é recoberta por LPG, um GIPL do tipo 2 ligado a membrana por um longo domínio repetitivo de polissacarídeos, os quais apresentam modificações espécies específicas da cadeia lateral (Turco e Descoteaux, 1992; McConville et al., 1995). Essas estruturas não possuem análogos em eucariotos superiores e podem representar uma vantagem evolucionária de adaptação ao modo de vida do parasito (Ferguson, 1999). As diferenças espécies específicas na estrutura da LPG parecem desempenhar um papel importante em definir a espécie de vetor utilizada pelo parasito (Pimenta et al., 1994). Com exceção a *L. major* (Moody et al., 1993) amastigotas, diferentemente de promastigotas, expressam menos ou nenhuma LPG. A LPG vem sendo implicada em inúmeras funções nos hospedeiros vertebrados. Por exemplo, experimentos *in vitro* demonstraram a 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 vetor, já que experimentos em animais ainda são conflitantes a esse respeito (Turco, 2001).

Similarmente ao observado em *Leishmania*, as moléculas mais abundantes da superfície celular de formas epimastigotas e metacíclicas de *T. cruzi* pertencem a uma pequena família de GILPs tipo 1 e glicoproteínas “mucina-like” ancorada via GPI (Previato et al., 1994).

Em epimastigotas de *T. cruzi* pode-se encontrar recobrimdo a superfície da membrana celular um glicolípido da família dos GILPs denominado LPPG, uma lipopeptidofosfoglicana (De Lederkremer et al., 1976, 1991; Previato et al., 1990). A LPPG é a molécula mais abundante da superfície de formas epimastigotas (Ferguson, 1997). Sua expressão parece ser regulada de acordo com o ciclo de vida do parasito, já que está presente em pouca quantidade nos estágios que infectam hospedeiros mamíferos (formas tripomastigotas sanguíneos e metacíclicos). Apesar disso, alguns estudos mostraram que a LPPG pode ter papel importante na relação hospedeiro-parasito. Foi mostrado que a LPPG inibe *in vitro* a produção de IL-2, bem como a proliferação de linfócitos CD4 (+) e CD8 (+). A ação potencial dessa molécula parece estar relacionada à sua porção ceramida e não ao oligossacarídeo ou inositol (Gomes et al., 1996). De fato a porção ceramida da LPPG foi capaz de induzir “*in vitro*” endocitose, bem como apoptose de macrófagos infectados na presença de interferon gama e independentemente da secreção de óxido nítrico (Frei de Lima et al., 1998). A LPPG difere das GILPs de *Leishmania* pela presença de fosfoceramida, uma característica encontrada em LPPG de *Acanthamoeba castellanii*. (Turco, 2003).

Outras moléculas de superfície celular importantes em *T. cruzi*, conforme dito anteriormente, são as mucinas. Essas moléculas são membros de uma família de glicoproteínas O-glicosiladas, ancoradas por GPI, similares a mucinas de eucariotos superiores. São abundantes na superfície celular de todas as formas evolutivas, onde formam uma camada que se estende sobre os GILPs (Schenkman et al., 1993a; Acosta-Serrano et al., 2001).

As mucinas podem diferir de acordo com os hospedeiros nos quais são isoladas, por exemplo, formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos encontradas em insetos migram em SDS-PAGE respectivamente como bandas de 35-43 kDa e 35-50kDa (Schenkman et al., 1993a; Previato et al., 1994) enquanto as de tripomastigotas de mamíferos migram entre 60 a 200 kDa (Schenkman et al. 1991, Almeida et al. 1994a).

As mucinas são os maiores substratos da trans-sialidase (TS), enzima secretada que tem sido muito relacionada em vários processos biológicos da interação hospedeiro-parasito, inclusive na invasão (Schenkman et al., 1991). A trans-sialidase tem como papel transferir ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para terminal β -Gal de oligossacarídeos das mucinas (Schenkman e Eichinger 1993; Schenkman et al., 1994a). A estrutura de oligossacarídeos O-ligados aceptores de ácido siálico parece ser conservada em formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos, porém polimorfismo foi identificado entre diferentes cepas, principalmente pela presença de galactofuranose ou galactopirranose (Turco, 2003). As diferenças nas estruturas de oligossacarídeos O-ligados das mucinas de diferentes cepas de *T. cruzi*, podem refletir a distinção das mesmas em infectividade e tropismo tecidual (Turco, 2003). Em *T. cruzi* foi atribuído às mucinas duas funções essenciais: interação célula-célula, ou célula moléculas e proteção da superfície celular contra a lise mediada por complemento, e contra a ação de C3 convertase inibindo a ligação de anticorpo anti Gal (Frasch, 2000).

Pouco se sabe sobre a relação dessas moléculas e “tripanosomatídeos inferiores”, entretanto foi demonstrado em *Tripanosoma carassii*, um tripanosomatídeo de peixe, a presença de genes que codificam para TS e mucinas (Aguero et al., 2002)

1.3 Imunorreatividade cruzada entre tripanosomatídeos

O compartilhamento de epitopos entre tripanosomatídeos é um fenômeno conhecido e descrito desde a década de 60, quando trabalho pioneiro de Camargo e Rebonato em 1969 mostrou a presença de imunorreatividade cruzada entre *T. cruzi* e *Leishmania* sp. A imunorreatividade cruzada entre os tripanosomatídeos de interesse médico é bem demonstrada na literatura por diferentes metodologias de imunodiagnóstico (Camargo e Rebonato, 1969; Malchiodi et al., 1994; Vexenat et al., 1996; Marcipar et al., 2005). A utilização de antígenos, obtidos especificamente a partir de extratos de formas de cultivo desses parasitos frequentemente carecem de especificidade quando utilizados na discriminação sorológica entre os mesmos, fato que ilustra a extensão do compartilhamento antigênico entre esses importantes patógenos. Nessa mesma linha, diferentes trabalhos demonstram como foco a caracterização parcial por western blotting dos antígenos compartilhados entre esses organismos, sua ampla variedade e diferentes pesos moleculares, comuns a ambos, *Leishmania* sp e *T. cruzi*. (Malchiodi et al., 1994; Vexenat et al., 1996). Esse fato prejudicou ao longo dos anos a especificidade de testes de imunodiagnóstico para leishmanioses e doença de Chagas.

Estudos realizados desde o início da década de 70, também evidenciaram claramente a existência de reatividade imunológica cruzada entre tripanosomatídeos patogênicos e não patogênicos. Um dos estudos pioneiros

realizados nesta década mostrou a existência de antígenos comuns entre tripanosomatídeos não patogênicos e o *T. cruzi*. Esse trabalho especificamente mostrou que a imunização de camundongos com formas de cultivo de *Leptomonas pessoai*, tripanosomatídeos de inseto, induziu proteção parcial contra infecção experimental por *T. cruzi*. Além disso, soros hiperimunes de camundongos infectados com *L. pessoai* reagiam cruzadamente por imunodifusão com extrato antigênico total de *T. cruzi*. (Souza et al., 1974).

Já havia sido verificado anteriormente que soros de pacientes com doença de Chagas aglutinavam formas de cultivo tanto de *Crithidia oncopelti* como de formas epimastigotas de *T. cruzi*. A pré-absorção desses soros com *C. oncopelti* removeu parcialmente a capacidade de aglutinação (Vattuone e Yanovisky, 1971). A utilidade desses tripanosomatídeos como modelos vacinais foi reforçada por estudo que demonstrou a intensa reatividade para *T. cruzi* de soro hiperimune de camundongos e coelhos infectados com *Phytomonas serpens*. Os camundongos imunizados com *P. serpens* apresentaram uma significativa redução da parasitemia e mortalidade quando desafiados com *T. cruzi* e comparados a animais controles não imunizados (Breganó, et al., 2003). Também foi demonstrado que a imunização de camundongos com *P. serpens* induziu imunidade protetora contra *T. cruzi* e que a mesma dependia da produção de óxido nítrico durante a fase aguda da infecção chagásica (Pinge-Filho et al., 2005). Posteriormente Elias et al., (2009) demonstrou a capacidade antigênica de uma cisteína peptidase de 30 kDa de *P. serpens* bioquimicamente similar a cruzipaina de *T. cruzi* que era reativa por ELISA com soro de pacientes com doença de Chagas. Um fato interessante é que por marcação imunocitoquímica essa molécula foi encontrada em diversos compartimentos do *T. cruzi* incluindo livremente na bolsa flagelar o que sugeriu sua excreção/secreção.

Outro estudo, conduzido por Graça de Souza et al. (2010) utilizando proteoma de *Phytomonas serpens*, demonstrou extensa similaridade antigênica

entre este tripanosomatídeo e *T. cruzi*, pela identificação de mais de 30 proteínas reativas com soro de paciente com doença de Chagas. Os autores consideraram esse trabalho de importante contribuição para o aprofundamento do estudo de possíveis moléculas vacinais.

A partir dos trabalhos pioneiros da década de 70, já anteriormente citados ocorreu a primeira tentativa de utilizar tripanosomatídeos de insetos no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Estudo amplo conduzido por Lopes et al. (1981) avaliou por IFI, aglutinação direta e fixação de complemento a imunorreatividade cruzada entre antígenos de nove espécies de tripanosomatídeos dos gêneros *Crithidia*, *Herpetomonas* e *Leptomonas* com soro de pacientes que apresentavam doença de Chagas. Os melhores resultados, excetuando os obtidos com *T. cruzi* (100%) foram obtidos com *Herpetomonas muscarum muscarum* que apresentou elevada reatividade por IFI (98,7%). Muitos anos depois foi proposto a utilização da *Crithidia luciliae* como fonte antigênica alternativa para o imunodiagnóstico da doença de Chagas por ELISA, em estudo que mostrou 100% de sensibilidade e 83% de especificidade (Monteon et al., 1997). Entretanto, por immunoblotting, utilizando como critério de positividade exclusivamente a reatividade com a banda protéica de 30kDa presente no extrato antigênico total de *C. luciliae*, a especificidade subiu para 97%. O próprio trabalho anteriormente citado de Breganó et al.(2003) mostrou reatividade de soros de pacientes com doença de Chagas por IFI com *P. serpens*. Entretanto, apesar de todos os soros de pacientes testados apresentarem reatividade para *P. serpens*, os títulos foram inferiores aos obtidos quando se utilizou *T. cruzi* como antígeno.

Em relação a imunorreatividade cruzada com *Leishmania*, apesar de poucos estudos, relatos pioneiros da década de 70 também já constatavam esse fenômeno. Trabalho do final dessa década mostrou, por IFI, reatividade cruzada entre soros de pacientes com Leishmaniose visceral e *Crithidia luciliae*. Devido a facilidade de

obtenção e cultivo desse parasito os autores sugeriram a possibilidade da utilização dos mesmos como antígenos no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral, apesar de acreditarem na necessidade de maiores estudos (Hedge et al., 1978). Na mesma época e um ano depois, baseado no trabalho de Hedge et al. (1978) foi mostrado também a presença de altos títulos de anticorpos reativos para *Crithidia sp* no soro de pacientes com leishmaniose visceral (Lopes-Brea et al., 1978; Lopes-Brea, 1979). Décadas depois estudos propuseram a utilização de parasitos do gênero *Crithidia* para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar (Gonçalves et al., 2002) e leishmaniose canina (Martinkovic e Marinculic, 2006).

Os dados relacionados nessa introdução demonstram a possibilidade da utilização de moléculas de antígenos heterólogos provenientes desses tripanosomatídeos para o diagnóstico sorológico das espécies patogênicas. Sem dúvida existe uma relação direta entre essas moléculas e a imunorreatividade cruzada encontrada entre esses tripanosomatídeos. Entretanto poucos trabalhos têm avaliado essa relação do ponto de vista da caracterização bioquímica de moléculas antigênicas comuns ou similares que seriam capazes de produzir resposta imunológica em pacientes infectados. O estudo de diferentes preparações antigênicas, como por exemplo, moléculas excretadas-secretadas, muito pouco exploradas nesse contexto e com destacada importância no imunodiagnóstico das leishmanioses ((Martin et al., 1998; Cibrelus et al., 1999) e doença de Chagas (Umezawa et al., 1996; 2001) poderiam enriquecer o conhecimento a respeito da imunorreatividade cruzada encontrada entre esses tripanosomatídeos. Vale ressaltar que uma vantagem do uso de antígenos de tripanosomatídeos de insetos está no fácil e barato cultivo desses organismos e de sua não patogenicidade em indivíduos imunocompetentes

2 OBJETIVOS

- a - Avaliar comparativamente a imunorreatividade cruzada entre diferentes preparados antigênicos (ES e ET) de Tripanosomatídeos não patogênicos (*Crithidia deanei* e *Leptomonas seymouri*) e anticorpos de hospedeiros humanos infectados com *Leishmania spp.* e *Trypanosoma cruzi*.
- b- Caracterizar bioquimicamente grupos de moléculas responsáveis pela imunorreatividade cruzada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Parasitos

3.1.1 Cultivo de *Leishmania (Leishmania) chagasi*

As formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* (MHOM/Br/1972/LD) foram cultivadas em frascos plásticos (Corning, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil), utilizando-se como meio de cultura Liver Infusion Tryptose (LIT) (Castellani et al., 1967), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 5% de urina masculina estéril (Howard et al., 1991). As culturas foram mantidas à temperatura de 26°C, sem agitação e repiques semanais foram efetuados na fase exponencial de crescimento. Nesta fase os promastigotas foram coletados, centrifugados à 3.000 rpm por 15 minutos e utilizados na preparação do extrato antigênico total (ET).

3.1.2 Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas do *T. cruzi*, cepa Y, foram cultivadas utilizando-se meio de LIT suplementado com 10% de SFB e mantidas à temperatura de 28°C, com agitação. Os repiques foram efetuados semanalmente na fase exponencial de crescimento. Nesta fase os promastigotas foram coletados, centrifugados à 3.000 rpm por 15 minutos e empregados na preparação do extrato antigênico total (ET).

3.1.3 Cultivo dos “tripanosomatídeos não patogênicos” *Crithidia deanei* e *Leptomonas seymouri*.

Linhagens aposimbióticas dos tripanosomatídeos *Crithidia deanei* (TCC 036E) e *Leptomonas seymouri* (TCC 011E) foram cedidas, após tipagem molecular, pelo grupo da Dra. Marta. M. G. Teixeira do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas-USP (Teixeira et al., 2001). Os parasitos foram cultivados em frascos plásticos (Corning, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil), utilizando-se como meio de cultura LIT sem adição de SFB. As culturas foram mantidas à temperatura de 26°C sem agitação e repiques semanais foram efetuados na fase exponencial de crescimento. Nesta fase os parasitos foram coletados, centrifugados à 3.000 rpm por 15 minuto e empregados na preparação do extrato antigênico total (ET).

3.2 Obtenção dos preparados antigênicos

3.2.1 Obtenção do extrato antigênico total (ET)

A preparação do extrato antigênico total seguiu o protocolo proposto por (Umezawa et al., 1996) para *T. cruzi*. Os parasitos *L. seymouri*, *C. deanei*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi* foram coletados da cultura na fase exponencial de crescimento, lavados e centrifugados por 3 vezes (3.000 rpm, 15 minutos à 4 °C) em tampão fosfato 0,01M, pH 7,2, contendo NaCl 0,8% (phosphate buffer saline=PBS). O sedimento obtido após centrifugação foi pesado e para cada 500 µg foram adicionados diferentes volumes de NaOH 0,3 M, dependendo do parasito utilizado, afim

de se obter a completa dissolução do mesmo. Após 18 horas, sob agitação magnética constante á 4°C, o pH foi neutralizado com diferentes volumes de HCl 0,3N lentamente em banho de gelo, evitando a precipitação antigênica. O material foi então centrifugado à 3000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante estocado á -70°C até o momento do uso.

3.2.2 Obtenção de antígenos excretados-secretados (ES) de *L. (L.) chagasi*, *L. seymouri* e *C. deanei*.

Os antígenos excretados-secretados foram obtidas do sobrenadante de cultura de *L. seymouri*, *L. (L.) chagasi* e *C. deanei* segundo protocolo proposto por Umezawa et al., 1996, com algumas modificações. Os parasitas foram cultivados em meio LIT, coletados na fase exponencial de crescimento (3^o - 4^o dia) e lavados por 3 vezes (3.000 rpm, 15 minutos) em meio RPMI. Os sedimentos parasitários foram ressuspensos em uma nova alíquota de RPMI com concentração de 5x10⁶ células/mL e incubados à 26°C num período que variou de 1, 3, 6, 12, 24, 48 horas. Após esse tempo cada sobrenadante foi coletado, centrifugado à 3.500 rpm, por 15 minutos a 4°C e estocado à -70°C até o momento do uso sem nenhuma concentração ou purificação.

3.2.3 Obtenção das moléculas excretadas-secretadas de formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* (TESA = Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens)

Os antígenos excretados/secretados de formas tripomastigotas (TESA) foram obtidos do sobrenadante de cultura de células LLCMK₂ infectadas com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* (Umezawa et al., 1996). A partir do 5^o dia de infecção os

sobrenadantes que continham um número mínimo de 5×10^6 parasitas/ml, foram utilizados. Esses sobrenadantes foram centrifugados à 4000 rpm, por 15 minutos a 4 °C, e armazenados à temperatura de -70°C até o momento do uso.

3.4 Dosagem protéica dos extratos antigênicos

A concentração protéica de cada extrato antigênico (Tabela 1- Resultados) foi obtida com o auxílio do Kit comercial Macro BCA Protein Assay Reagent kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Segundo as especificações do kit, alguns elementos constituintes de certos meios de cultura causam interferências na dosagem protéica. Por esse motivo não foram determinadas as concentrações protéicas dos antígenos ES, obtidos do sobrenadante de culturas celulares.

3.5 Amostragem de soros, anticorpos monoclonais, policlonais monoespecíficos e eluatos

3.5.1 Soros

Foram utilizadas **139** amostras de soros de pacientes classificados como a seguir:

- a) **51 amostras** de soro de pacientes com leishmaniose visceral (LV) parasitologicamente positivos (presença de amastigotas no aspirado de medula óssea) provenientes da região endêmica do Piauí, Brasil e

cedidas pela Dra. Carla Barbieri, da Universidade Federal de São Paulo (Pinheiro et al; 2005).

- b) **23 amostras** de soro de pacientes com leishmaniose tegumentar sendo cutânea (8) muco cutânea (15), gentilmente cedidos pelo Dr Angelo Lindoso do Instituto Emilio Ribas, São Paulo, Brasil.
- c) **19 amostras** de pacientes com doença de Chagas (CH, 17 na fase crônica e 2 na aguda) de diferentes regiões endêmicas do Brasil, armazenadas no bio repositório do laboratório de Protozoologia, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.
- d) **26 amostras** de soro de pacientes com diagnóstico de diferentes doenças infecciosas ou auto-imunes, sendo 9 pertencente a pacientes positivos para malária *P. vivax* (6) e *P. falciparum* (3), toxoplasmose (2), toxocaríase (2), esquistossomose (2), lúpus eritematoso sistêmico (6) e artrite reumatóide (5), obtidas do bio repositório do laboratório de Protozoologia, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
- e) **20 amostras** de soro de indivíduos saudáveis, utilizados como controle negativo obtido do bio repositório do laboratório de Protozoologia, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

3.5.2 Anticorpos monoclonais e policlonais monoespecíficos

3.5.2.1 Anticorpos monoclonais

O anticorpo anti superfície de formas amastigotas de *T. cruzi* (Ssp4) foi gentilmente cedido pela Dra. Norma Andrew do laboratório de biologia celular e genética molecular, da universidade de Maryland (Andrews et al; 1987). O anticorpo anti α tubulina foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil).

3.5.2.2 Anticorpos policlonais monoespecíficos

O soro hiperimune anti LPPG foi obtido de um coelho imunizado com lipopeptidofosfoglicanas de formas epimastigotas de *T. cruzi*. (Golgher et al., 1993). O soro anti *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foi produzido em coelho imunizado com formas promastigotas lisadas de *L. (L.) amazonensis*. O soro anti *Leptomonas seymouri* foi obtido de coelho imunizado com *Leptomonas seymouri*.

3.5.2.3 Anticorpos policlonais monoespecíficos anti *L. seymouri* obtidos por eluição ácida

Membranas de nitrocelulose 0,45 µm (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) foram sensibilizadas com 1ml de ES ou ET de *L. seymouri* (4,5 ug/mL), ou ES de *L. (L.) chagasi* sob leve agitação por 12-18 horas em temperatura ambiente (TA). Após esse período, as membranas contendo os antígenos adsorvidos foram lavadas 1 vez com PBS e incubadas sob leve agitação por 24 horas à TA com *pool* de soros de LV diluído 1:200 durante 30 minutos. Após este tempo os anticorpos específicos foram eluídos com tampão ácido glicina 0,1 M, pH 2,6, contendo NaCl 0,8M. Após 5 minutos sob agitação constante à TA, o pH do eluato foi neutralizado pela adição de tampão Tris 1 M pH 9,7 e armazenado a -70°C até o momento do uso.

3.5.2.4 Obtenção de anticorpos anti ES de *L. seymouri* ou ES de *L. (L.) chagasi* absorvidos com antígenos homólogos e heterólogos

Para obtenção dos anticorpos absorvidos soro de paciente com LV diluído (1:200) foi incubado (v/v) por 30min. à temperatura ambiente com ES de *L.*

seymouri (1:40) ou ES de *L.(L) chagasi* 1:20. Em seguida foram submetidos ao ELISA (item 3.6) com placas sensibilizadas com os ES de *L. seymouri* ou *L.(L) chagasi*. As porcentagens de absorção e reatividade foram calculadas considerando a reação obtida com o soro antes da absorção e o limiar de reatividade para cada antígeno.

3.6 ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay)

Placas de poliestireno Costar, “high binding” (Corning Incorporated, New York, NY, USA) de 96 cavidades foram sensibilizadas com 50 µL dos antígenos ES ou ET, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6, respectivamente para as seguintes concentrações: *L.seymouri* - ES 1:40, ET 4,5µg/mL; *C. deanei* - ES 1:40; ET 10µg/mL; *L.(L.) chagasi* – ES 1:20, ET 12,0µg/mL; *T. cruzi* ES - 1:60; ET 5,0µg/mL. Em seguida as placas foram incubadas por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após este tempo as placas foram lavadas uma vez com PBS e bloqueadas com 100 µL de uma solução de PBS contendo 0,05% de Tween (PBS-T) e 5% de leite Molico desnatado (Nestlé, São Paulo, SP, Brasil) por 30 minutos à TA. Após esse tempo foram adicionados 50 µL dos soros diluídos em PBS-T leite 1% (1:200) e as placas incubadas por 1 hora a 37 °C. Após 5 lavagens com PBS-T, foram adicionados 50 µL de anti-IgG humano conjugados à peroxidase, (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA) diluídos 1:3000 em PBS e as placas foram incubadas por 1 hora à 37°C. Posterior a outro ciclo de lavagem, a reação antígeno-anticorpo foi revelada com 12,5 mL de tampão citrato-ácido cítrico 0,05 M pH 5,0.contendo 5 mg de o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) acrescido de 7,5 µL

peróxido de hidrogênio (H_2O_2 30%), por 30 minutos a 37 °C em ambiente escuro. A reação foi interrompida pela adição de 25 μL de HCl 4 N. As densidades ópticas foram obtidas no leitor de ELISA (Multiskan-Titertek II), no comprimento de onda de 492 nm (Absorbâncias= $\text{Abs}_{492\text{nm}}$).

3.6.1 Oxidação dos epitopos de carboidratos com metaperiodato de sódio (NaIO_4)

Após sensibilização da placa de ELISA com os antígenos de ES (1:40) ou ET (4,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de *L. seymouri*, os mesmos foram submetidos ao tratamento v/v com 50 μL de NaIO_4 (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) na concentração de 20 mM, por 1 hora à TA em câmara escura. Em seguida as placas foram lavadas 3x com PBS e então bloqueadas por 30 minutos à TA com 100 μL de leite Molico desnatado (Nestlé, São Paulo, SP, Brasil) a 5%, em PBS-T 0,05%, contendo 100 mM de glicina (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil). Os passos seguintes foram efetuados de acordo com o protocolo descrito para ELISA, no item 3.6.

3.6.2 Tratamento químico do antígeno com proteinase K.

Os antígenos ES (1:40) e ET de *L. seymouri* (4,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram incubados v/v por 1 hora à 37 °C. com 5 μL de uma solução de proteinase K (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasi) na concentração de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em seguida os antígenos foram utilizados para sensibilizar as placas e o ELISA foi procedido conforme item 3.6.

3.7 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida

Os componentes protéicos contidos nos ES e ET e parasitas íntegros de *L. seymouri* foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS 0,1% (Duodecil Sulfato de Sódio) (Laemmli, 1970) no sistema de mini gel (8,5 x 5,0 cm, Bio-Rad Co) utilizando gel de separação (300 mM Tris-HCl pH 8,6; SDS 0,1%; acrilamida 29,2%; N,N metileno bis acrilamida 0,8%; persulfato de amônia 0,03% e N,N,N,N-tetrametilenodiamida 0,1% - Temed) na concentração de 10% para ES ou 12% para ET, e gel de empilhamento na concentração de 4%.

As amostras foram diluídas v/v (ET) ou 4:1 (ES) em tampão de amostra, pH 6,8 (160 mM Tris HCl; SDS 5%; 50 mM de glicerol e 0,02% de azul de bromofenol) concentrado respectivamente 2 ou 5 vezes e incubadas a 100°C por 5 minutos. Para eletroforese em condições não redutoras, o ES de *L. seymouri* foi diluído 4:1 em tampão de amostra sem a presença do agente redutor 2-mercaptoethanol e não foi submetido ao processo de denaturação pelo aquecimento.

As amostras foram aplicadas no gel no volume de 30 µl/canaleta, quando se utilizou um pente de teflon de 10 orifícios e 400 µl quando se utilizou um pente único de 90 mm de largura e 1 mm de espessura.

Os parasitas íntegros (5×10^6 cel/ml) foram diluídos com 150 µl de tampão de lise contendo inibidores de protease [NP40 1%; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM M- α -p-tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK); 1 mM Fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) e 2,8 U/ml Aprotinina] e incubados por 5 minutos a 4°C. Após este tempo adicionou-se 150 µl de tampão de amostra e a mistura foi aquecida a uma temperatura de 100 °C por 5 minutos e aplicadas 30 µl/canaleta.

A corrida eletroforética foi efetuada utilizando-se um tampão de corrida (75 mM Tris; 576mM glicina pH 8,6 e SDS 0,1%) e submetida a uma corrente de 100V, por aproximadamente 2 horas.

Marcadores de peso molecular (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) foram utilizados como padrões de peso molecular correspondentes às seguintes proteínas, Sigma High: 29 kDa (Anidrase Carbônica), 45 kDa (Albumina de ovo), 66 kDa (Albumina bovina), 97 kDa (Fosforilase B), 116 kDa (Galactosidase) e 205 kDa (Miosina) ou Sigma-Low: 14,4 kDa (α -Lactalbumina), 20,1 kDa (inibidor de tripsina), 30 kDa (Anidrase carbônica), 43 kDa (Albumina de ovo), 67 kDa (Albumina bovina) e 94 kDa (Fosforilase B).

3.7.1 Transferência eletroforética de proteínas

A transferência eletroforética das proteínas separadas por SDS-PAGE, para membranas de nitrocelulose (NTC) 0,45 μ m (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) foi realizada de acordo com a técnica descrita por Towbin e colaboradores (1979). A transferência foi executada no sistema semi-seco (Semi-Phor TE 70 - Hoeffer Sc Instruments Co., Holliston, MA, USA) por 1 hora sob ação de uma corrente elétrica de 0,9 mA/cm² utilizando um tampão de transferência (25mM Tris; 192mM glicina e metanol 20% pH 8,3).

A eficiência da transferência das frações protéicas e a localização das proteínas do padrão de PM, nas membranas de NTC, foram efetuadas usando-se o corante Ponceau (Ponceau-S 0,2% ácido acético 1%). A região correspondente ao marcador do PM, corada com o Ponceau, localizada nas membranas, foi recortada, corada com amido black 0,1% e descorada com ácido acético 7%. A membrana restante corada com Ponceau foi descorada com PBS.

3.7.2 Immunoblotting

A membrana de nitrocelulose contendo os antígenos foi bloqueada com a solução de PBS contendo 5% de leite desnatado Molico (Nestlé, São Paulo,

SP, Brasil) e, incubados por 1 hora à TA, sob agitação constante. As membranas bloqueadas foram incubadas com os soros diluídos (1:100) em PBS contendo 1% de leite, por 2 horas à TA, sob agitação constante. Após 5 lavagens (5 minutos cada) com PBS, as membranas foram incubadas com conjugados peroxidase anti-IgG humano (1:4000) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) diluídos em PBS, por 2 horas à TA sob agitação. Após novo ciclo de lavagens em PBS, os imune complexos foram visualizados por meio da adição de 500 µl de uma solução reveladora (6 mg de 4-Cloro-naftol; 2 ml de metanol; 10 ml de PBS e 10 µl de H₂O₂). A reação foi interrompida por adição de água destilada, após o aparecimento das bandas. As membranas foram lavadas com água destilada e colocadas entre dois papéis de filtro para secagem. A documentação foi realizada por fotografias ou digitalizada em um programa de computador.

3.7.3 Análise por Immunoblotting após tratamento com metaperiodato de sódio (NaIO₄)

As membranas de nitrocelulose contendo os antígenos ES e ET de *L. seymouri* foram submetidas ao tratamento com 500uL de NaIO₄ (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) na concentração de 20 mM, por 1 hora a TA em câmara escura sob agitação constante. Após duas lavagens com PBS por 5 minutos cada, as membranas foram bloqueadas por 1 hora. com PBS contendo 5% de leite desnatado Molico e 100mM de glicina (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil). Todo o procedimento subsequente foi idêntico ao descrito para a reação de Immunoblotting no item anterior 3.7.2.

3.7.4 Concentração das amostras de ES de *L. seymouri*

Especificamente para verificação de atividade proteolítica o ES de *L. seymouri* foi concentrado 40X por centrifugação em membrana de ultrafiltração Amicon Ultra 10K (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA).

3.7.5 Atividade proteolítica detectada em gel contendo gelatina

A atividade proteolítica de ES de *L. seymouri* (1X e 40X concentrado) foi analisada após eletroforese em condições não redutoras em gel a 10% de poliacrilamida-SDS, contendo 500 ug/ml de gelatina copolimerizada (Alfieri et al 1989). Após a separação eletroforética conforme item 3.7 de material e métodos, gel foi incubado por 1 h sob agitação constante à temperatura ambiente com tampão acetato de sódio 0,1M, pH 6,0, contendo 2,5% de Triton X-100. Logo após uma troca do tampão e incubação por mais uma hora, o gel foi incubado pela noite por 18 horas sob as mesmas condições. O gel foi corado com Azul de Coomassie R-250 para visualização de bandas indicando atividade proteolítica, claras contra um fundo azul

3.8 Análise dos dados

Para determinar o limiar de reatividade (LR) de todos os antígenos submetidos ao ELISA foram utilizados 20 amostras de pacientes saudáveis. O LR foi calculado adicionando-se três desvios-padrão (Standard deviation=SD) à média aritmética das Absorbâncias ($\sum \text{Abs}_{492\text{nm}} + 3\text{SD}$) (Kurstak, 1985).

A análise estatística foi efetuada pelo método OneWay-Anova com comparação múltipla de Dunnett, baseada em comparações múltiplas entre as Abs médias dos diferentes preparados antigênicos. A determinação da significância estatística entre as diferenças das médias foi mensurada pelo valor p, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os valores estatísticos foram calculados pelo software Prism™ versão 3.0 (Graphpad software, inc 1999) para Windows®.

Os gráficos da distribuição individual de ($\text{Abs}_{492\text{nm}}$) de cada soro foram obtidos pelo software Prism™ versão 3.0 (Graphpad software, inc 1999) para Windows®. Nos gráficos dos ELISAs a linha horizontal, para cada antígeno, representa a média das Abs $_{492\text{nm}}$ ($\sum \text{Abs}_{492\text{nm}}$).

4 RESULTADOS

4.1 Critério de escolha dos tripanosomatídeos.

Um estudo anterior teve como intuito verificar se indivíduos infectados com *Leishmania* spp e com *T. cruzi* apresentavam estímulo humoral para reconhecer epitopos presentes em tripanosomatídeos não patogênicos ao homem: *B. culicis*, *C. deanei*, *C. fasciculata*, *C. luciliae*, *L. seymouri* e *P. serpens*. Os resultados obtidos pelo ELISA mostrou que estes parasitos apresentavam potencial suficiente para serem utilizados como antígenos alternativos para o diagnóstico da doença de Chagas e/ou leishmaniose visceral. Entretanto os anticorpos presentes em soros de pacientes chagásicos (fase crônica ou aguda) apesar de reagirem com o extrato total (ET) destes tripanosomatídeos as positivities e títulos não eram semelhantes aos obtidos com o parasita homólogo *T. cruzi*.

Entretanto, os títulos apresentados pelos pacientes com leishmaniose visceral (LV) foram mais altos para os parasitas *C. fasciculata*, *C. luciliae*, *L. seymouri* do que para o próprio antígeno homólogo *L. (L.) chagasi*. Títulos mais baixos foram obtidos para os parasitos *C. deanei*, *B. culicis* e *P. serpens*. Adicionalmente a estes resultados, estes parasitos utilizados como antígeno no ELISA apresentaram baixa porcentagem de reatividade cruzada quando avaliados com amostras de soros de indivíduos normais ou com outras doenças.

Outro estudo mostrou que a resposta humoral de pacientes chagásicos era ineficiente para produzir anticorpos capazes de reconhecer epitopos em exoantígenos (excretado-secretado-ES) de formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*, apesar de apresentarem alta reatividade com o extrato total (ET, Figura1).

Baseados nestes dois fatos inéditos nosso intuito seguinte foi analisar quais moléculas presentes na fração excretada-secretada (ES) por *C. fasciculata*, *C. luciliae*, e *L. seymouri* eram responsáveis pela alta afinidade apresentada pelos anticorpos presentes em pacientes com diferentes enfermidades

Os dados preliminares mostraram que os antígenos ES de 4 tripanosomatídeos reagem com diferentes positivities quando testados com casos chagásicos (Figura1). O dado mais promissor foi aquele no qual pacientes chagásicos não reagem ou reagem pouco com o antígeno ES de *L. seymouri* e *C. deanei*, mas apresentavam altos títulos para ES de *C. luciliae* e *C. fasciculata* (Figura 1). A partir deste dado preliminar os tripanosomatídeos selecionados para este estudo foram a *L. seymouri* e *C. deanei*.

Figura 1 - Análise da reatividade de casos chagásicos ($n=10$, CH) pelo ELISA-ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *C. fasciculata*, *C. luciliae*, e *L. (L.) chagasi* e ET de *T. cruzi*. As barras horizontais representam as médias aritméticas de reatividade para cada antígeno ($\Sigma \text{ Abs}_{492\text{nm}}$)

4.2 Moléculas excretadas-secretadas por *L. seymouri*

Os experimentos de identificação de moléculas antigênicas presentes na fração de excretação-secreção dos parasitos iniciou-se pela análise da cinética de tempo de liberação desta moléculas por *L. seymouri*. Incubando-se 5×10^8 parasitos/ml em meio de cultura RPMI estes parasitos liberam moléculas quantitativamente proporcionais ao tempo de incubação, sendo precocemente liberadas após 1h de incubação. A maior reatividade, em termos quantitativos, foi observada no ES obtido após 3-48hs de incubação do parasito. Os diferentes sobrenadantes analisados por ELISA apresentaram altos títulos de reatividade quando incubados com um caso de leishmaniose visceral (LV), mas títulos semelhantes foram obtidos no ES coletado após 6, 12, 24 e 48 h de incubação (Figura 2)

Como esperado, o soro de um paciente chagásico (CH) apresentou baixa reatividade para o ELISA-ES de *L. seymouri*, assim como não houve reatividade cruzada com amostra de soro de um paciente saudável (normal) (Figura 2).

Figura 2 - Análise da reatividade (Abs_{492nm}) dos soros de pacientes com LV, CH e indivíduo saudável (normal) por ELISA com ES de *L. seymouri* obtidos após 1h, 3h, 6h, 12h, 24h e 48h de incubação.

A influência do meio de cultura no fenômeno da excreção-secreção foi avaliada incubando-se 5×10^8 parasitos/ml nos meios de cultura líquido de LIT ou meio RPMI e após 24 horas de incubação os sobrenadantes contendo os ES foram analisados por ELISA.

A reatividade de soros de pacientes com LV (LV1, LV2) e de CH foi mais elevada para a fração ES obtida no meio RPMI (ES-RPMI) do que a obtida em meio LIT (ES-LIT) (Figura 3). A hipótese da baixa reatividade do ES-LIT pode ser justificada pela interferência de moléculas proteicas não antigênicas contidas no meio LIT, que estariam competindo com os antígenos parasitários na ligação à placa de poliestireno. O meio de LIT não contém nenhum componente antigênico, uma vez que não apresentou nenhuma reatividade quando incubado com soros de LV ou CH (dados não mostrados).

Figura 3 - Análise da reatividade (Abs 492nm) dos soros de pacientes com LV (LV1, LV2), CH e de indivíduo saudável (normal) com ELISA- ES de *L. seymouri* obtido após 24 horas de incubação em meios LIT ou RPMI.

4.3 Enzyme-immunosorbent-assay (ELISA)

4.3.1 Dos antígenos

As concentrações ($\mu\text{g/ml}$) ideais dos antígenos ES e ET de *L. seymouri* e *C. deanei* a serem utilizadas no ELISA foram obtidas após análise das curvas de titulação dos antígenos diluídos na razão 2, a partir de 1:10 para ES e 1:125 para ET e incubados com 2 soros de pacientes com leishmaniose visceral (LV), 1 com doença de Chagas (CH) e 1 de indivíduo saudável, diluídos a 1:200 (Tabela 1).

Como a dosagem proteica dos antígenos ES foi ineficaz pela interferência de componentes presentes no meio de cultura, estes foram utilizados na maior diluição que resultou na maior reatividade, em experimento de titulação cruzada. A fração ES, independentemente do tripanosomatídeo testado, foi sempre obtida sob as mesmas condições pela incubação de 5×10^8 parasitas/ml, por 24 horas em meio de cultura RPMI.

Tabela 1 - Concentrações protéicas ($\mu\text{g/ml}$) ou diluições (10^{-1}) dos antígenos ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*, utilizadas no ELISA

Tripanosomatídeos	Ags	$\mu\text{g/ml}$ ou 10^{-1}
<i>Leptomonas seymouri</i>	ES	1/40
	ET	4,5
<i>Crithidia deanei</i>	ES	1/40
	ET	10,0
<i>Leishmania chagasi</i>	ES	1/20
	ET	12,0
<i>Trypanosoma cruzi</i>	ES	1/60
	ET	5,0

4.3.2 Do limiar de reatividade

O limiar de reatividade (LR) para cada preparação antigênica foi obtido somando-se três desvios padrões à média aritmética ($\Sigma + 3SD$) da reatividade de 20 soros de indivíduos saudáveis. Os valores de LR para cada antígeno e a distribuição das absorvâncias individuais estão apresentados na figura 4.

Figura 4 - Distribuição da reatividade (Abs_{492nm}) de soros de indivíduos saudáveis ($n=20$) por ELISA-ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*. As barras horizontais representam as médias aritméticas de reatividade para cada antígeno (ΣAbs_{492nm}) LR = limiar de reatividade.

4.3.3 Reatividade dos antígenos ES e ET de *L. seymouri* e *C. deanei*

Como os resultados preliminares mostraram que pacientes LV podem ser discriminados dos CH pelas suas reatividades, que vai depender do tipo de antígeno utilizado no ELISA, as próximas etapas consistiram da análise de um

número maior de pacientes chagásicos e com leishmaniose visceral avaliados pelo ELISA- ES e ET de *L. seymouri* e *C. deanei*,

4.3.4 Casos de leishmaniose visceral (LV)

A positividade apresentada pelos pacientes com LV (n=51) foi de 100% quando testado com os ELISA- ES e ET do parasito homólogo *L.(L.) chagasi* e com altas médias de reatividades tanto para o antígeno ES ($1,91 \pm 0,81$) como para o antígeno ET ($1,56 \pm 0,740$). A análise do ELISA-ES e ET de *L. seymouri* mostrou que além de reagirem com todos os casos de LV (100%) as médias de reatividade dos antígenos ES ($1,09 \pm 0,58$) ou ET ($1,82 \pm 0,44$) foram muito próximos àquelas obtidas pela *L.(L.) chagasi* (Figura 5, Tabela 2).

Figura 5 - Distribuição da reatividade (Abs_{492nm}) de soros de pacientes com LV (n=51), por ELISA-ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*. As barras horizontais representam as médias aritméticas de reatividade (Σ Abs_{492nm}) para cada antígeno

Entretanto a análise dos antígenos de *C. deanei* mostraram que este parasito possui menos epitopos antigênicos do que o *L. seymouri*, com positivities inferiores, de 70,6% para o antígeno ES e 92% para o ET, adicionado de médias de reatividade mais baixas de $0,49 \pm 0,42$ para ES e $0,66 \pm 0,41$ para ET (Figura 5, Tabela 2).

Os casos de LV também apresentaram alta positividade de 96% quando testados com o ELISA-ET de *T. cruzi* e com média de reatividade de $0,78 \pm 0,45$ (Figura 5, Tabela 2). Entretanto casos de LV raramente reagem com o ELISA- TESA de *T.cruzi* com reação cruzada com somente 2% dos casos (Figura 5, Tabela 2).

Tabela 2 - Número, porcentagem de casos positivos (*n*, %) e média aritmética ($\sum \text{Abs}_{492\text{nm}} \pm \text{SD}$) da reatividade dos casos de leishmaniose visceral (*n*=51) avaliados pelo ELISA- ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L.(L.) chagasi* e *T. cruzi*

Tripanosomatídeo	Ags	<i>n</i>	%	$\sum \text{Abs}_{492\text{nm}} \pm \text{SD}$
<i>L. seymouri</i>	ES	51	100	$1,09 \pm 0,58$
	ET	51	100	$1,82 \pm 0,44$
<i>C. deanei</i>	ES	36	70,6	$0,49 \pm 0,42$
	ET	47	92	$0,66 \pm 0,41$
<i>L. (L.) chagasi</i>	ES	51	100	$1,91 \pm 0,81$
	ET	51	100	$1,56 \pm 0,74$
<i>T. cruzi</i>	ES	1	2	$0,11 \pm 0,08$
	ET	49	96	$0,78 \pm 0,45$

Ags- antígenos

ET – extratos total

ES- excretado/secretado

n – Número de casos positivos

% – porcentagem de casos positivos

$\sum \text{Abs}_{492\text{nm}} \pm \text{SD}$ – Médias aritméticas de $\text{Abs}_{492\text{nm}}$ +/- desvio padrão

A análise estatística não mostrou diferenças significativas ($P>0,05$) entre o ELISA-ET de *L. seymouri* e ELISA-ET do parasito homólogo *L. (L.) chagasi*, mas diferenças significativas foram obtidas com os ELISA-ES ou ET de *C. deanei* e *T. cruzi* ($P<0,01$).

Uma análise dos títulos de reatividade mostrou que 74,5% ($n=38$) dos soros de LV apresentavam Abs_{492nm} maior que 1,00 (Abs_{492nm} $>1,00$) quando testados com o ELISA-ET da *L. (L.) chagasi* e média de reatividade de $1,90 \pm 0,51$, e para o ELISA-ES de $2,31 \pm 0,43$. Estes soros analisados pelo ELISA-ET e ES da *L. seymouri* também apresentaram resultados semelhantes, de $1,93 \pm 0,42$ para o ET e de $1,22 \pm 0,59$ para o ES (Figura 6A, Tabela 3).

O restante dos soros deste grupo correspondente a 25,5% ($n=13$) apresentavam reatividade de Abs_{492nm} menor que 0,99 (Abs_{492nm} $<0,99$) para o ELISA-ET da *L. (L.) chagasi* com média de reatividade de $0,56 \pm 0,18$ e para o antígeno ES de $0,73 \pm 0,42$. Entretanto o ELISA-ET de *L. seymouri* apresentou reatividades mais elevadas de $1,51 \pm 0,35$ e com diferença estatística significativa ($P<0,01$) quando comparado ao ELISA-ET de *L. (L.) chagasi* (Figura 6B, Tabela 3). Este grupo de soros não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os antígenos ES de *L. seymouri* ($0,72 \pm 0,33$) e de *L. (L.) chagasi* ($0,73 \pm 0,42$) ($P>0,05$).

O fato do ELISA-ET de *L. seymouri* apresentar maior sensibilidade na detecção de casos de LV de baixa reatividade para o ELISA-ET do parasito homólogo *L. (L.) chagasi*, nos abriu a possibilidade de pensar na sua utilização como antígeno alternativo no diagnóstico da LV.

Por outro lado, os casos de LV que apresentaram reatividade de Abs_{492nm} $> 1,00$ para ELISA-ET de *L. (L.) chagasi* apresentaram médias de reatividade menores para o ELISA-ES de *C. deanei* ($0,58 \pm 0,45$) ou ET ($0,71 \pm 0,41$) (Figura 6A, Tabela 3). O grupo com Abs_{492nm} $< 0,99$ apresentou baixa positividade e também baixas média de reatividade com ELISA-ES de *C. deanei* ($0,28 \pm 0,31$) ou ET ($0,52 \pm 0,39$)

(Figura 6B, Tabela 3). As médias de reatividade para ELISA-ET de *T. cruzi* dos soros com Abs > 1,00 foi de $0,86 \pm 0,47$ e para os soros com Abs < 0,99 de $0,55 \pm 0,27$ (Tabela 3).

Figura 6 - Distribuição da reatividade de soros de pacientes com LV ($n=51$) por ELISA-ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*. (A) soros de LV com reatividade >1,00 ($n=38$) e (B) soros de LV com reatividade < 0,99 ($n=13$) para ELISA-ET de *L. (L.) chagasi*. As barras horizontais representam as médias aritméticas de reatividade ($\Sigma \text{Abs}_{492\text{nm}}$) para cada antígeno

Tabela 3 - Positividade e $\sum \text{Abs}_{492\text{nm}}$ +/-SD dos vários antígenos com soros de pacientes com LV ($n=51$) classificados em dois grupos de acordo com sua reatividade para o ELISA-ET de *L.(L.) chagasi* em $\text{Abs}_{492\text{nm}} > 1,00$ e $\text{Abs}_{492\text{nm}} < 0,99$

Tripanosomatídeos	Ags	ELISA-ET de <i>L.(L.) chagasi</i> (médias +/-SD)			
		%P	(LV, $n=38$) Abs> 1, 00	%P	(LV, $n=13$) Abs< 0,99
<i>L. seymouri</i>	ES	100	$1,22 \pm 0,59$	100	$0,72 \pm 0,33$
	ET	100	$1,93 \pm 0,42$	100	$1,51 \pm 0,35$
<i>C. deanei</i>	ES	84,2	$0,58 \pm 0,45$	30,8	$0,28 \pm 0,31$
	ET	97,4	$0,71 \pm 0,41$	69,2	$0,52 \pm 0,39$
<i>L.(L.) chagasi</i>	ES	100	$2,31 \pm 0,43$	100	$0,73 \pm 0,42$
	ET	100	$1,90 \pm 0,51$	100	$0,56 \pm 0,18$
<i>T.cruzi</i>	TESA	2,6	$0,11 \pm 0,08$	0	$0,11 \pm 0,02$
	ET	97,4	$0,86 \pm 0,47$	84,6	$0,55 \pm 0,27$

Ags- antígenos

%P porcentagem de casos positivos

ET- antígeno extrato total

ES- antígeno excretado-secretado

$\sum \text{Abs}_{492\text{nm}} \pm \text{SD}$ – Médias aritméticas de Abs 492nm +/- desvio padrão

4.3.5 Casos de leishmaniose tegumentar.

A análise de 23 casos de indivíduos com leishmaniose tegumentar (LT, 8 de leishmaniose cutânea e 15 de leishmaniose mucocutânea) mostrou a alta especificidade do ELISA- ES de *L. seymouri* ou de *C. deanei* por não apresentarem nenhum caso de reação cruzada com os soros de LT, entretanto 34,7% destes casos apresentaram reatividade cruzada com ELISA-ES de *L. (L.) chagasi* ($0,28 \pm 0,21$) e apenas 4,3 % para TESA de *T.cruzi* (Figura 7, Tabela 4).

Apesar dos soros de LT apresentarem baixa ou nenhuma reatividade cruzada com antígenos ES, estes apresentaram positivities de 69,5 % para o ELISA-ET de *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi* com médias de reatividade muito semelhantes entre si, respectivamente de $0,76 \pm 0,65$ e $0,64 \pm 0,54$ (Figura 7, Tabela 4). A positividade de 60% foi alcançada pelo ELISA-ET de *T. cruzi* e de 52,2%, para *C. deanei* e com médias de reatividade de $0,54 \pm 0,43$ e $0,38 \pm 0,35$ respectivamente (Figura 7, Tabela 4). Esses dados indicam que moléculas excretadas/secretadas por *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi* apresentam poucos epitopos compartilhados com os extratos totais.

Figura 7 - Distribuição da reatividade dos soros de pacientes com LT ($n=23$) por ELISA-ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*. As barras horizontais representam as médias aritméticas de reatividade ($\Sigma \text{ Abs}_{492\text{nm}}$) para cada antígeno

Tabela 4 - Número, porcentagem de positivos (n , %) e média aritmética ($\sum \text{Abs}_{492\text{nm}} \pm \text{SD}$) da reatividade dos casos de leishmaniose tegumentar ($n=23$) avaliados por ELISA- ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L.(L.) chagasi* e *T. cruzi*

Tripanosomatídeos	Ags	n	%	$\sum \text{Abs}_{492\text{nm}} \pm \text{SD}$
<i>L. seymouri</i>	ES	0	0	$0,09 \pm 0,06$
	ET	16	69,5	$0,76 \pm 0,65$
<i>C. deanei</i>	ES	0	0	$0,09 \pm 0,05$
	ET	08	52,2	$0,38 \pm 0,35$
<i>L (L.) chagasi</i>	ES	08	34,7	$0,28 \pm 0,21$
	ET	16	69,5	$0,64 \pm 0,54$
<i>T. cruzi</i>	ES	1	4,3	$0,13 \pm 0,18$
	ET	14	60,1	$0,54 \pm 0,43$

Ags - antígenos

ET – extrato total

ES - excretado-secretado

n – número de casos positivos

% – porcentagem de casos positivos

$\sum \text{Abs}_{492\text{nm}} \pm \text{SD}$ – médias aritméticas de Abs 492nm +/- desvio padrão

4.3.6 Casos de doença de Chagas

Os soros dos pacientes com doença de Chagas ($n=19$) apresentaram positividade de 100% quando testados com os antígenos TESA e ET do parasita homólogo *T. cruzi*, com médias de reatividade muito elevadas, respectivamente de $2,15 \pm 0,55$ e $1,70 \pm 0,53$, porém sem diferenças significativas entre si (Figura 8, Tabela 5).

Esses soros apresentaram reatividade cruzadas de 94,7% e 68% respectivamente com os antígenos ET de *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi* e médias de

$0,95 \pm 0,36$ e $0,53 \pm 0,44$ sem diferenças significativas entre si (Figura 8, Tabela 5). Novamente os antígenos ES apresentaram baixa reatividade cruzada de 32% para ES de *L. seymouri* e 5,3 % para ES de *L. (L.) chagasi*, cujas médias de reatividade foram também baixas, respectivamente de $0,20 \pm ,16$ e $0,12 \pm 0,02$, sem diferenças significativas entre si (Figura 8, Tabela 5).

Esses dados mostram que preparados antigênicos diferentes (ES e ET) de *L. seymouri* apresentam reatividades diferentes quando testados com pacientes com diferentes doenças, e que o antígeno ES apresenta forte identidade antigênica com o parasito *L. (L.) chagasi* comparado ao *T. cruzi*.

Figura 8 - Distribuição da reatividade dos soros de pacientes com CH ($n=23$) por ELISA-ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L.(L.) chagasi* e *T. cruzi*. As barras horizontais representam as médias aritméticas de reatividade ($\Sigma \text{ Abs}_{492\text{nm}}$) para cada antígeno.

A análise dos resultados obtidos com os antígenos ES e ET de *C. deanei* mostraram sua ineficiência tanto na sensibilidade com positivities respectivamente de 73,6% e 57,8% e baixas médias de reatividade para ES ($0,34 \pm 0,19$) e ET ($0,38 \pm 0,24$) (Figura 8, Tabela 5).

Tabela 5 - Número porcentagem de positivos (*n*, %) e média aritmética ($\sum \text{Abs}_{492\text{nm}} \pm \text{SD}$) dos casos de doença de Chagas (*n*=19) avaliados por ELISA-ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L.(L.) chagasi* e *T. cruzi*

Tripanosomatídeos	Ags	<i>n</i>	%	$\sum \text{Abs}_{492\text{nm}} \pm \text{SD}$
<i>L. seymouri</i>	ES	6	32	$0,20 \pm 0,16$
	ET	18	94,7	$0,95 \pm 0,36$
<i>C. deanei</i>	ES	14	73,6	$0,34, \pm 0,19$
	ET	11	57,8	$0,38 \pm 0,24$
<i>L.(L.) chagasi</i>	ES	1	5,3	$0,12 \pm 0,02$
	ET	13	68,0	$0,53 \pm 0,44$
<i>T. cruzi</i>	ES	19	100	$2,15 \pm 0,55$
	ET	19	100	$1,70 \pm 0,53$

Ags - antígenos

ET- extratos total

ES - excretado-secretado

n – Número de casos positivos

% - porcentagem de casos positivos

$\sum \text{Abs}_{492\text{nm}} \pm \text{SD}$ – Médias aritméticas de $\text{Abs}_{492\text{nm}}$ + desvio padrão

4.3.7 Casos com outras doenças

A eficiência dos antígenos testados foi evidenciada pela ausência de reatividade cruzada com 26 soros de pacientes portadores de diferentes doenças auto-imunes ou infecciosas [malária infectados pelo *P. vivax* ($n=6$), ou por *P. falciparum* ($n=3$); de toxoplasmose ($n=2$); de toxocaríase ($n=2$); de esquistosomose ($n=2$); de doenças auto-imunes ($n=11$)] (Figura 9).

Figura 9 - Distribuição da reatividade dos soros de pacientes portadores de outras doenças ($n=26$), por ELISA-ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*. As barras horizontais representam a média aritmética ($\Sigma \text{Abs}_{492\text{nm}}$) para cada antígeno.

A tabela 6 apresenta resumidamente as positivities obtidas no ELISA - ES e ET dos parasitos *L. seymouri*, *C. deanei*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*

Tabela 6 - Número, porcentagem de casos positivos (*n*, %) e média aritmética ($\sum \text{Abs}_{492\text{nm}} \pm \text{SD}$) da análise dos diferentes grupos de soros (LV, LT, CH, OD e S) com antígenos ES e ET de *L. seymouri*, *C. deanei*, *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*

Tripanosomatídeos	Ags	LV	LT	CH	OD	S
		<i>n</i> =51	<i>n</i> =23	<i>n</i> =19	<i>n</i> =26	<i>n</i> =20
<i>L. seymouri</i>	ES	100	0	32	0	0
	ET	100	69,5	94,7	0	0
<i>C. deanei</i>	ES	70,6	0	73,6	0	0
	ET	92	52,2	57,8	0	0
<i>L. (L.) chagasi</i>	ES	100	34,7	5,3	0	0
	ET	100	69,5	68	0	0
<i>T. cruzi</i>	ES	02	4,3	100	0	0
	ET	96	60,1	100	0	0

Ags - antígenos

ET - extratos total

ES - excretado/secretado

n - número de soros

LV - leishmaniose visceral

LT - leishmaniose tegumentar

CH - doença de Chagas

OD - Outras doenças

S - Indivíduos saudáveis

4.4 Análise das moléculas liberadas por *L. seymouri*

A investigação da presença de moléculas como proteases no ES de *L. seymouri*, identificada por eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em condições não denaturantes, contendo 0,1% de gelatina, mostrou atividade proteolítica na região de peso molecular (PM) aproximado entre 50-60 kDa (Figura 10, linha 2). Entretanto na amostra concentrada 40 vezes a presença de maior atividade proteolítica mostra a grande quantidade de proteases existentes na região de 50 a 116 kDa (Figura 10, linha 4). Em condições denaturantes, como era de se esperar, houve o desaparecimento desta atividade (Figura 10, linhas 3 e 5) e bandas não proteolíticas foram observadas na região de PM aproximado entre 66-97kDa, apenas com a amostra concentrada 40 vezes (Figura 10, linha 5),

Figura 10 - Detecção de proteases no ES de *L. seymouri* por SDS-PAGE em condições não denaturante (linhas 2, 4) e denaturante (linhas 3, 5) e ES 40x concentrado (linhas 4, 5), corado com Comassie Blue. PM= Peso molecular (linha 1)

4.5 Imunoreatividade dos antígenos ES-ET de *L. seymouri* por Immunoblotting

Experimento para avaliar a imunorreatividade do ES de *L. seymouri* por immunoblotting e consequentemente a influência dos meios de cultura LIT e RPMI na obtenção do antígeno apresentou resultados diferentes daqueles obtidos no ELISA (Tabelas 2 e 5; Figura 3). Inicialmente observou-se que o ES utilizado no Immunoblotting (ES-blot) apresentava bandas reativas quando incubado com soro de paciente chagásico e quase imperceptíveis ou ausentes quando incubado com o soro de um paciente com LV (Figura 11B, linhas 1 e 2), independente do meio de cultura no qual se obteve o ES. O soro de um paciente chagásico incubado com o ES-blot de *L. seymouri* obtido em meio LIT reagiu com 3 bandas de PM aproximado entre 66 a 97kDa (Figura 11A, linha 1) e com 5 bandas de PM de 66 a 140 kDa naquele obtido do meio RPMI (Figura 11A, linha 2).

Figura 11 - Análise por Immunoblotting da reatividade de soros de pacientes de CH e LV com ES de *L. seymouri* obtido em meio de cultura LIT (1) e meio RPM (2), incubados com soro de CH (A) e LV (B). À esquerda das figuras estão indicados os pesos moleculares (kDa)

No ES obtido em meio RPMI, o ELISA apresentou 100% de reatividade com soros de LV e elevada média de abs, $1,09 \pm 0,58$ (Tabela 2) e títulos baixo para o ES obtido no meio LIT (Figura 3). Provavelmente o processo de denaturação das proteínas que ocorre na técnica do SDS-PAGE pode ter diminuído drasticamente a reatividade com os soros de LV.

A hipótese da denaturação protéica influenciando a reatividade do ES de *L. seymouri* por Immunoblotting e resultando na perda de reatividade com o soro LV, foi testada com o antígeno submetido a diferentes condições. O ES tratado com tampão de amostra contendo a substância redutora e fervido a 100°C por 5 minutos (Figuras 12A e 12B) mostrou reatividade mais intensa com soros de CH (Figura 12 A, linhas 1-3) comparado ao preparado em condições não redutoras (Figura 12 A', linhas 1-3). Os soros de LV reagiram fracamente com o antígeno ES independentemente das condições de tratamento do antígeno (Figuras 12 B e 12 B', linhas 1-3).

Figura 12 - ES-blot de *L. seymouri* com ES preparado em condições denaturante (A, B) e não denaturante (A', B') e reatividade com soros de CH (A, A', linhas 1 a 3) e de LV (B, B', linhas 1 a 3). Os marcadores de PM (kDa) estão indicados à esquerda das figuras

O experimento da cinética de liberação de moléculas do *L. seymouri* por 24h ou 48h de incubação em meio RPMI mostrou que após 24hs o soro de CH reconhece bandas na região de 66 a 97 kDa, porém com maior intensidade no ES coletado após 48h de incubação (Figura 13A, linhas 2 e 3). Entretanto mais uma vez a reatividade com soro de LV foi quase imperceptível (Figura 13B, linhas 2 e 3).

Apesar do ES apresentar poucas bandas, somente reconhecidas pelo soro de CH havia a possibilidade destas serem originárias de produtos de lise celular, ocorrido durante o processo de obtenção do antígeno. Esta hipótese foi verificada incubando-se o ES-blot (Es de 48h) com o anticorpo monoclonal anti-tubulina. A tubulina é uma proteína interna formadora de microtubulos de células e normalmente presente em soluções com lise celular. A figura 13C, linha 3, mostra que o monoclonal anti-tubulina não reagiu com nenhuma banda no ES-blot, entretanto intensa reatividade foi observada na região de aproximadamente 50 kDa, com o parasito lisado (Figura 13C, linha 1). A preparação com parasita lisado mostrou que o *L. seymouri* apresenta inúmeras moléculas imunogênicas reconhecidas tanto pelo soro de CH (Figura 13A, linha 1) como de LV (Figura 13B, linha 1).

Figura 13 - Análise por imunoblotting de *L. seymouri* preparado com lisado de 5×10^8 parasitas (1); ES obtido após 24 de incubação em meio RPMI (2); ES obtido após 48 horas de incubação em meio RPMI (3), e incubados com soro de CH (A); LV (B) e monoclonal anti-alfatubulina (C). Os marcadores de PM (kDa) estão indicados à esquerda das figuras

Figura 14 - Análise por imunoblotting de *L. seymouri*: lisado de 5×10^8 parasitas (1); antígeno ET (2), incubados com soro LV (A), e CH (B). Os marcadores de PM (kDa) estão indicados à esquerda das figuras

Como descrito acima o Immunoblotting preparado com o lisado de *L. seymouri* apresentou reatividade com várias bandas independentemente do soro utilizado de LV ou de CH (Figuras 14A , 14B, linha 1) mas, quando o antígeno ET de *L. seymouri* foi analisado por Immunoblotting (ET-blot) o soro de CH reagiu intensamente com bandas principalmente na região entre 29-36 kDa (Figura 14A, linha 2), já o soro de LV reagiu com poucas bandas nesta região (Figura 14B linha 2).

4.6 Caracterização da imunoreatividade das moléculas ES e ET de *L. seymouri*

Como epítomos protéicos e de carboidratos imunogênicos estão presentes em abundância na superfície celular de vários tripanosomatídeos, foram executados experimentos para verificar se a reatividade dos antígenos ES e ET de *L. seymouri* era dirigida para componentes protéicos ou para cadeias de carboidratos.

Inicialmente foram avaliados os antígenos ET e ES submetidos à digestão química, por tratamento com Proteinase K (PK) para digestão das proteínas ou oxidação das cadeias de carboidrato pelo tratamento com o metaperiodato de Sódio (NaIO_4). Porcentagens de queda foram calculadas baseadas na amostra controle sem tratamento em relação ao limiar de reatividade de 0,17 para o antígeno ES e 0,25 para o ET.

O ELISA-ES mostrou que soros de pacientes com LV reagem preferencialmente com epítomos de natureza protéica e menos para epítomos de carboidratos. O ES tratado com PK mostrou queda de reatividade para 3 soros analisados de 100%, 100% e 73%. O ES tratado com NaIO_4 apresentou respectivamente queda de reatividade de 11%, 20% e 58% (Figura 15 A). Por outro lado os 3 soros de CH apresentaram quedas significativas pelo tratamento com PK de 100%, 70% e 100% e o tratamento com NaIO_4 de 100% (Figura 15B).

Figura 15 - Reatividade (Abs_{492nm}) de 3 soros de LV (A) e 3 de CH (B) por ELISA com antígenos ES de *L. seymouri* tratados ou não com proteinase K (2ug/ml de PK) e metaperiodato de sódio (20mM, NaIO₄). A tabela abaixo da figura apresenta a porcentagem de queda da reatividade dos antígenos

O tratamento do antígeno ET de *L. seymouri* com PK mostrou a abolição dos epitopos reconhecidos pelo de LV ou de CH, com queda na reatividade de 100%, 100% e 86% para os soros de LV e 100% para os soros de CH (Figuras 16A e 16B). Entretanto o tratamento do ET com NaIO_4 observou-se queda bem menor, de 21%, 29% e 12,5% pra os soros de LV e 38%, 31% e 47% para os soros de CH (Figuras 16A e 16B).

Figura 16 - Reatividade ($\text{Abs}_{492\text{nm}}$) de 3 soros de LV (A) e 3 de CH (B) por ELISA com antígeno ET de *L. seymouri*, tratados ou não com proteinase K (2ug/ml de PK) e metaperiodato de sódio (20mM, NaIO_4). A tabela abaixo da figura apresenta a porcentagem de queda da reatividade

A despeito da ausente ou muito baixa reatividade por immunoblotting dos soros de LV com os preparados ES e ET de *L. seymouri*, a reatividade mais intensa para soros de CH mostrou que os epítomos das bandas na região de 66 a 97 kDa do ES-blot de *L. seymouri* (Figura 17 A, linhas 1, 2) reconhecidos por dois soros de CH são moléculas contendo carboidratos (Figura 17 A), pois estas bandas desapareceram completamente após tratamento com metaperiodato de sódio (Figura 17 A, linhas 1', 2'). Entretanto o ET-blot antes ou pós tratamento com metaperiodato de sódio não apresentou queda visível da reatividade na região de 29-36kDa (Figura 17B, linhas 3, 3'). Indicando que as moléculas contidas no ET são constituídas principalmente de epítomos protéicos.

Figura 17 - Reatividade por Immunoblotting de soros de CH com ES (A) e ET (B) de *L. seymouri* tratados com metaperiodato de sódio (20 mM - linhas 1', 2', 3') e controle sem tratamento (linhas 1, 2, 3). Os marcadores de PM (kDa) estão indicados à esquerda das figuras

A identidade entre os antígenos ET e ES de *L. seymouri*, com ES e ET de *L. (L.) chagasi*, parasito causador da LV, poderia indicar quais seriam os epítomos imunogênicos compartilhados entre estes dois parasitos reconhecidos pelos soros de LV.

Para este experimento inicialmente foram utilizados anticorpos policlonais de LV específicos para epítomos contidos no ET de *L. seymouri*, obtidos por eluição ácida (mat e met, item **3.5.2.3**) Esses anticorpos eluídos apresentaram reatividade de 100% com ET de *L. seymouri*, mas de 31% para o ES, 45% para ES de *L. (L.) chagasi* e 27% para o ET (Figura 18 A).

Os anticorpos eluídos do antígeno ES de *L. seymouri* reagiram com maior título com ET de *L. seymouri*, o qual consideramos como 100%, já a reatividade obtida com o próprio ES foi de 45%. Reatividades de 29 e 28% foram obtidas respectivamente com ES e ET de *L. (L.) chagasi* (Figura 18 B).

Quando anticorpos foram eluídos do antígeno ES de *L. chagasi* estes reagiram com o antígeno de origem (100%) e com o antígeno ET de *L. (L.) chagasi*, 93%. Estes anticorpos reconheceram 72% dos epitopos de ET de *L. seymouri*, e 25% de ES de *L. seymouri* (Figura 18C) Consideramos que estes dados indicam por essa metodologia que existem epitopos comuns entre ES, ET de *L. seymouri* e principalmente entre ET de *L. seymouri* e ES de *L. (L.) chagasi*.

Figura 18 - Análise por ELISA (abs 492nm) da reatividade de ES e ET de *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi*, com anticorpos policlonais de LV eluídos de (A)- ET de *L. seymouri*; (B)- ES de *L. seymouri* e (C)- ES de *L. (L.) chagasi*. A linha pontilhada representa o limiar de reatividade. Os números acima das barras representam a porcentagem de reatividade

No próximo experimento tentamos avaliar as similaridades entre os antígenos ES de *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi* por meio de absorção dos soros de LV com antígenos homólogos (ES *L. (L.) chagasi*) e heterólogos (ES de *L. seymouri*) e em seguida análise por ELISA com os antígenos ES de *L. seymouri* e de *L. (L.) chagasi*.

Os resultados mostraram que a absorção do soro LV com ES de *L. seymouri* foi efetiva, pois esta amostra não reagiu com o antígeno homólogo (ES *L. seymouri*) mas apresentou queda de 38% para o antígeno heterólogo ES de *L. (L.) chagasi*, portanto com reatividade de 62% (Figura 19 A)

A absorção do soro LV com ES de *L. (L.) chagasi* apresentou queda total para o antígeno homólogo ES *L. (L.) chagasi* e 47% para o heterólogo ES *L. seymouri*, com reatividade de 53% (Figura 19 B)

A hipótese é que os antígenos ES de *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi* compartilham em torno de 53%-62% dos antígenos (Figura 19A e B).

Figura 19 - Análise por ELISA (abs 492nm) da reatividade de ES de *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi*, com soro de LV absorvido (30 min.- 37°C) com A- ES de *L. seymouri* e B- ES de *L. (L.) chagasi*. A linha pontilhada representa o limiar de reatividade. A tabela abaixo representa as porcentagens de absorção e reatividade

4.7 Identificação de epítomos imunogênicos por anticorpos monoclonais e policlonais monoespecíficos

A tentativa de identificar epítomos compartilhados entre os antígenos ES e ET de *L. seymouri* e de *L. (L.) chagasi* foi efetuada utilizando-se alguns soros policlonais monoespecíficos e monoclonal, cujas reatividades estão apresentadas na figura 20.

Os antígenos ET de *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi* compartilham alguns epítomos semelhantes como os reconhecidos pelo soro monoclonal anti-alfa-tubulina que está ausente nos antígenos ES (Figura 20).

Epítomos somente presentes nos antígenos ES e ET da *L. seymouri* foram identificados pelo soro policlonal anti *L. seymouri* ausentes nos antígenos de *L. (L.) chagasi* (Figura 20) Esta elevada reatividade foi completamente abolida após oxidação com metaperiodato de sódio (dados não mostrados).

O soro policlonal anti *L. amazonenses* reagiu com ET tanto da *L. seymouri* como da *L. (L.) chagasi*, um pouco menos com ES de *L. (L.) chagasi* e não reagiu com ES de *L. seymouri* (Figura 20). O soro policlonal monoespecífico anti-lipolifosfoglicana de *T. cruzi* (LPPG) reagiu de forma elevada com ET de *L. seymouri* e bem mais modesta com ET de *L. (L.) chagasi*. (Figura 20). Reatividades semelhantes entre todos os antígenos testados foram obtidas com os anticorpos monoclonais anti proteína de superfície de amastigota de *T. cruzi* (SSP4) com baixos valores de abs e reatividade mais elevada com os ETs(Figura 20).

Figura 20 - Análise por ELISA da reatividade dos antígenos ES e ET de *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi* com anticorpo monoclonal anti- α -tubulina; soros policlonais mono-específicos- anti- *L. seymouri*, anti- *L. amazonensis*, anti-LPPG, e monoclonal anti- SSP4. A linha pontilhada representa o limiar de reatividade

4.8 Avaliação imunodiagnóstica por Immunoblotting dos antígenos de *L. seymouri*

Como analisado anteriormente o immunoblotting preparado com o lisado de *L. seymouri* foi reconhecido por um soro de CH e outro de LV reagindo com várias bandas (Figura 21 A e B, linha 1). O teste com um soro de LT também mostrou que este paciente tinha anticorpos para moléculas do lisado de *L. seymouri* (Figura 21C,

linha 1). Entretanto soros de LV, ou LT apresentaram reatividades heterogêneas no ET-blot (Figuras 21A e 21C, linha 2), enquanto o soro de CH reagiu intensamente com bandas principalmente na região entre 29-36 kDa (Figura 21 B, linha 2).

O soro de LV reagiu fracamente e de LT não reagiu com o antígeno ES de *L. seymouri*, (Figura 21 A, B, C, linha 2), enquanto que o soro de CH também reagiu fracamente. Entretanto a medida que aumentou-se o número de amostras, soros de CH reagiram com diferentes porcentagens de positividade e intensidade (dados não mostrados). Soro de indivíduo saudável não reagiu com nenhuma das 3 preparações antigênicas (Figura 21 D, linhas 1, 2, 3)

A reatividade para as bandas na região de 29-36 kDa do ET-blot de *L. seymouri* foram confirmados quando um número maior de soros de CH foram analisados (Figura 22 A, linhas 1 a 9). Somente um soro coletado de um paciente de fase aguda inicial não reagiu com bandas desta região (Figura 22 A, linha 10), o que nos permite pensar que no início da doença Chagas o estímulo humoral para este epitopo é baixo, uma vez que outra amostra de soro de um paciente chagásico também de fase aguda mais tardia reagiu com bandas nesta região (Figura 2 A, linha 9).

Figura 21 - Comparação da reatividade por imunoblotting de (1) parasita lisado; (2) ET e (3) ES de *L.seymouri* incubados com soro (A) LV; (B) CH; (C) LT e (D) soro de indivíduo sadio. Os marcadores de PM (kDa) estão indicados à esquerda das figuras

Entretanto, a reatividade de soros de LV para bandas na região de 14-18kDa foi heterogênea (Figura 22B, linhas 1 a 7), assim como para casos de leishmaniose tegumentar (Figura 22C, linhas 1 a 4), e reatividades com menor intensidade para as bandas de 29-36kDa.

Soros de pacientes com outras doenças, exemplificado com uma amostra de soro coletado de um paciente com toxoplasmose (Figura 22D, linha 1) e de um indivíduo saudável (Figura 22D, linha 2) não apresentaram nenhuma reatividade com os antígenos analisados.

Figura 22 - Análise da reatividade, por imunoblotting, de antígeno ET de *L. seymouri* com soros de: (A) CH, 1 a 10; (B) LV , 1 a 7; (C) LT, 1 a 4; (D) toxoplasmose, 1; (D) indivíduo saudável, 2. Os marcadores de PM (kDa) estão indicados à esquerda das figuras

5 DISCUSSÃO

Nosso grupo, há mais de vinte anos, se dedica a linhas de pesquisa que objetivam estudar moléculas antigênicas com potencial para o aprimoramento do imunodiagnóstico da Doença de Chagas e mais recentemente da leishmaniose visceral humana e canina.

A robusta indução de imunidade humoral com produção de elevados níveis de anticorpos, característica dessas doenças (Saha et al., 2006) justifica, ao longo dos anos, a importância do imunodiagnóstico e o investimento de vários grupos de pesquisa no seu aprimoramento.

Dentre os diversos desafios encontrados nesses estudos destaca-se a existência de amplo mimetismo e ou compartilhamento antigênico que ocorre entre *T. cruzi* e *Leishmania* sp, descrito desde o final da década de 60 (Camargo e Rebonato, 1969). Esse fenômeno reflete diretamente no imunodiagnóstico dessas enfermidades (Vexenat et al., 1996; Marcipar et al., 2005) motivando, até hoje, muitas pesquisas na busca de testes laboratoriais efetivos e discriminatórios.

A base para explicar tal fato pode estar na relação filogenética e fenotípica que ocorre dentre organismos pertencentes à mesma família. Por exemplo, características biológicas comuns, como o fato de habitarem em algum momento durante seu ciclo natural de vida um hospedeiro invertebrado (Inverso et al., 1993), pode gerar pressões seletivas comuns ocasionando a existência e manutenção de um repertório molecular semelhante (Santos et al., 2006). Isso poderia também explicar o motivo dos tripanosomatídeos de insetos e plantas servirem como importantes modelos para o entendimento de processos biológicos e bioquímicos dos patogênicos, incluindo estudos mais aplicados que empregam esses organismos no

desenvolvimento de novos fármacos (Tasanor et al., 2006) e como antígenos para o imunodiagnóstico (Hedge et al., 1978; Lopez Brea, 1979; Lopes et al., 1981; Monteon et al., 1997; Gonçalves et al., 2002; Griemberg et al., 2006; Martinkovic e Marinculic, 2006).

A proposição alternativa da utilização de antígenos de tripanosmatídeos de insetos para o imunodiagnóstico das leishmanioses e doença de Chagas (Hedge et al., 1978; Lopez Brea, 1979; Lopes et al., 1981) foi preponderante na demonstração do fenômeno da imunorreatividade cruzada entre esses antígenos e anticorpos presentes no soro dos pacientes. Esses trabalhos tiveram origem no final da década de 70 e início de 80. Desde então, poucos foram os que avaliaram de forma crítica a extensão e importância de tal fenômeno. Da mesma forma, a literatura é escassa em trabalhos cujo foco visa à caracterização de moléculas antigênicas que poderiam responder por tal evento. Nesse sentido a avaliação de diferentes tripanosomatídeos e suas moléculas antigênicas poderia permitir a seleção e descoberta de antígenos alternativos para o imunodiagnóstico de leishmanioses e doença de Chagas. Aliado a isso, o fácil cultivo desses parasitos “in vitro” e sua não patogenicidade em indivíduos imunocompetentes despertou nosso interesse em desenvolver linha de pesquisa incluindo esses organismos.

Estudo inicial do nosso grupo que avaliou a imunorreatividade cruzada de cinco tripanosomatídeos de insetos e um de planta, escolhidos por maior relacionamento filogenético com *T. cruzi* ou leishmanias mostrou de um modo geral alta probabilidade de serem utilizados como antígenos alternativos para o imunodiagnóstico destas parasitoses. Entretanto, o resultado mais promissor foi aquele obtido em ELISA onde extratos antigênicos totais (ET) de *C. fasciculata*, *C. luciliae*, *L. seymouri* apresentaram positividade de 100% nos casos de leishmaniose visceral, com médias de reatividade mais elevadas do que o próprio antígeno homólogo de *L. (L.) chagasi*. A reatividade para esses antígenos não discriminou

entre infectados com *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*, fato que também ocorre no diagnóstico sorológico convencional de rotina. Baseado nesses resultados, estudo piloto foi conduzido empregando outro preparado antigênico, obtido de produto de excreção-secreção, que denominamos ES. Resultados preliminares indicavam que potencialmente ES de *L. seymouri* e *C. deanei* poderiam apresentar reatividade discriminatória entre *T. cruzi* e *Leishmania*, pois foram pouco reativos com pacientes que apresentavam Doença de Chagas (Figura 1). A partir desses dados iniciais, aprofundamos nossos estudos a fim de avaliar de forma comparativa a imunorreatividade cruzada entre moléculas presentes no ES-ET de *L. seymouri* e *C. deanei* em soros de pacientes com Doença de Chagas e Leishmanioses.

A idéia da utilização de moléculas antigênicas excretadas-secretadas se baseou em dados da literatura, inclusive de nosso grupo, que tem atribuído às mesmas relevante potencial antigênico para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas (Umezawa et al., 1996, 2001) e leishmaniose visceral (Martin et al., 1998; Cibrelus et al., 1999). Da mesma forma, apesar de alguns relatos na literatura, a presença de produtos de excreção-secreção com potencial imunogênico no meio de cultivo de alguns tripanosomatídeos de insetos e plantas é pouco explorada. Estudos mostram que similarmente aos patogênicos (Schumuñes et al., 1978), esses organismos podem liberar moléculas de superfície para o meio em que habitam. Contudo, somente metaloproteinases com características similares a GP63 de *Leishmania* sp (Jaffe e Dawyer, 2003; d'Avyla Levy et al., 2003; Elias et al., 2006, 2012) e cisteíno-peptidases (cruzipaina) de *T. cruzi* (Elias et al. 2008; 2009; 2012), vem sendo caracterizadas.

Independentemente das características antigênicas, conforme já citado, é fato a existência de amplo repertório de moléculas compartilhadas ou miméticas entre os membros da família *Trypanosomatidae*. Deste modo não nos surpreendeu os resultados de elevada imunorreatividade principalmente aqueles obtidos com

os preparados antigênicos de *L. seymouri*. Devido a esse fato e a menor imunorreatividade observada com *C. deanei*, optamos por analisar especificamente as moléculas antigênicas de *L. seymouri*.

A análise da imunorreatividade cruzada mostrou discrepâncias de reatividade dependendo do grupo de soros e preparado antigênico utilizado. Essas diferenças provavelmente não estão relacionadas à metodologia de preparo dos antígenos, pois a mesma foi rigorosamente semelhante para todos os tripanosomatídeos. Do mesmo modo, não encontra explicação na relação quantitativa das concentrações protéicas dos ET utilizados em ELISA. O cálculo das concentrações protéicas de uso foi obtido por meio de curvas de titulação para cada preparado antigênico, sendo que o ET de *L. seymouri* apresentou concentração inferior ao de *C. deanei*, *T. cruzi* e *L. (L.) chagasi* (Tabela 1). De qualquer forma, não se pode descartar o envolvimento de outras moléculas não protéicas como glicoconjugados que não foram dosadas, as quais poderiam contribuir para tal reatividade. Nossos dados mostraram que carboidratos são em certa parte responsáveis pela imunorreatividade de *L. seymouri* com soros de LV e CH (Figuras 15 A e B; 16A). Da mesma forma, apesar de não efetuada a dosagem protéica para os antígenos ES, devido a interferência de componentes do meio de cultivo com a metodologia de dosagem, os mesmos foram obtidos de forma padronizada de produto de excreção-secreção de 5×10^8 cel/ml em RPMI, por 24h . Vale ressaltar que a escolha desses parâmetros baseou-se inicialmente em experiência anterior de nosso grupo com TESA (Umezawa et al 1996., 2001) e ES de *Leishmania* sp. e em experimentos discutidos a seguir.

Com 1 hora de incubação em meio RPMI o *L. seymouri* já libera para o meio moléculas imunorreativas com soros de LV, porém títulos elevados e equivalentes foram observados entre 6-48 horas de incubação (Figura 2). Apesar de não existir diferença significativa de reatividade durante esse período, optamos por 24 horas

devido a facilidades técnicas e equiparação com os já padronizados ES de *L. (L.) chagasi* e TESA (Umezawa et al., 1996; 2001).

Estudos demonstraram que outro tripanosomatídeo de inseto, *Herpetomonas. samuel pessoai*, também após 1 hora, já libera para o meio de cultivo moléculas com atividade proteolítica similar a GP63 descrita em *Leishmania* sp. O pico de atividade ocorre entre 3-4 horas, sendo as mesmas reativas por immunoblotting com anticorpo monoclonal anti GP63 (Elias et al., 2005). Todavia, trabalhos que avaliam a presença de cisteíno peptidases em exoantígenos de *P. serpens* optam por produtos de excreção-secreção de 20 ou 48 horas (Elias et al., 2008, 2009).

Nossos dados também mostraram que existe influência na imunorreatividade do meio de cultivo (LIT e RPMI) do qual se obtém ES (Figura 3). O meio LIT é rico em nutrientes e muito comumente utilizado para o crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi* (Castellani et al., 1967) e portanto, foi o meio de cultivo de escolha para o crescimento de *L. seymouri* e *C. deanei*. Todavia, após cultivo em meio LIT, os parasitos eram incubados por 24h no próprio LIT ou RPMI para a obtenção do ES. A maior reatividade de ES de *L. seymouri* obtido de RPMI em relação ao obtido de LIT (Figura 3) pode ser explicada provavelmente pela presença de proteínas oriundas do LIT que podem ter competido ou interferido de algum modo com ligação das proteínas antigênicas do ES à placa de ELISA, inibindo assim a reatividade. Da mesma forma, a análise por immunoblotting mostrou reatividade mais intensa e com maior número de bandas com ES obtido de RPMI (Figura 11A). Trabalho recente mostrou que a excreção-secreção de proteases como GP63 e cruzipaina por *P. serpens* é modulada por proteínas exógenas como, por exemplo, aquelas presentes no meio de cultivo e nos fatores enriquecedores como soro fetal bovino (Elias et al., 2012). Trabalho anterior de mesma autoria e com o mesmo tripanosomatídeo mostrou que produtos de

excreção-secreção obtidos em solução salina (PBS-1%glicose) pobre em nutrientes, eram reativos por ELISA com soros de chagásicos (Elias et al., 2009). Assim sendo, o RPMI foi o nosso meio de escolha para a obtenção dos ES de *L. seymouri* e *C. deanei*, como tem sido para a obtenção de TESA (Umezawa et al 1996; 2001) e ES de *L. (L.) chagasi* rotineiramente em nosso laboratório.

Ainda no contexto de obtenção dos antígenos excretados-secretados, um ponto crucial foi determinar se os mesmos poderiam estar contaminados com antígenos provenientes de produtos de lise celular ocorrido durante a metodologia de obtenção. Para tanto um método simples para responder essa questão foi a análise da reatividade dos ES com anticorpo monoclonal anti-alfa tubulina. A tubulina é uma proteína intracelular que atua auxiliando na formação dos microtúbulos e citoesqueleto. Esta proteína normalmente se encontra presente em soluções com lise celular. Nossos resultados mostraram que ES de *L. seymouri* está livre de produtos de lise celular, devido a ausência de reatividade com anticorpo anti-alfa tubulina (Figuras 13C e 20). Da mesma forma, todos os ES utilizados nesse estudo estão livres de antígenos provenientes de lise celular (dados não mostrados).

Analisando especificamente a imunorreatividade cruzada com os casos de LV, a elevada positividade (100%) e médias de reatividade obtidas com os preparados antigênicos ES-ET de *L. seymouri* (tabela 2 e Figura 5) revelou a existência de antígenos comuns entre esse tripanosomatídeo e a *L. (L.) chagasi*. Comparativamente, a menor reatividade com ES e ET de *C. deanei* (Tabela 2 e Figura 5) implica talvez em menor relacionamento antigênico com *L. (L.) chagasi*. Diferentemente do observado com ES-ET de *L. seymouri*, forte discrepância de positividade e reatividade foi observada entre os antígenos de *T. cruzi* e soros de LV (Tabela2, Figura 5). A ausência de reatividade observada com TESA, diferentemente do encontrado com ET, denota que os antígenos secretados-

excretados apresentam elevada especificidade para soros de CH e diferem em epitopos reativos dos ET, conforme mostrado anteriormente por nosso grupo (Umezawa et al., 1996; 2001).

Um dado muito interessante que reforça o relacionamento molecular entre *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi* foi obtido quando dividimos a análise da imunorreatividade de soros de LV de acordo com a absorbância ($< 0,99$ e $> 1,00$) para o antígeno homólogo ET de *L. (L.) chagasi*. Médias de reatividade mais elevadas dos antígenos ES e ET de *L. seymouri*, foram obtidas principalmente nos casos de LV (25,5%) com reatividade mais baixa $< 0,99$ para o antígeno homólogo (Tabela 3, Figura 6B). A média de reatividade para esse grupo de soros foi estatisticamente maior ($p < 0,01$) com o antígeno heterólogo ET de *L. seymouri* do que com os homólogos ES-ET de *L. (L.) chagasi*. Uma hipótese para explicar tal fato poderia ter relação com a possível produção de anticorpos especificamente por esse grupo de pacientes contra moléculas com elevada similaridade à *L. (L.) chagasi*, porém presentes de forma mais abundante, principalmente no ET de *L. seymouri*. Por fim esses dados indicam que antígenos de *L. seymouri*, apresentaram maior sensibilidade na detecção de casos de LV com baixa reatividade para o antígeno homólogo ET de *L. (L.) chagasi*, o que de certo modo o potencializa como provável antígeno alternativo para o imunodiagnóstico da leishmaniose visceral.

Comparativamente entre os preparados antigênicos de *L. seymouri*, a média de reatividade mais elevada para ET do que ES pode ter sido favorecida pela característica das diferentes preparações antigênicas. Antígenos ET obtidos por digestão alcalina dos parasitos íntegros podem apresentar maior variedade de moléculas intracelulares antigênicas que não são secretadas ou excretadas, justificando assim médias de reatividade mais elevadas. Por outro lado, comparativamente, a reatividade de soros de LV e CH com os preparados antigênicos homólogos (ES e ET de *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*) de certa forma

contraria essa teoria (Figura 5, 6A e 6B). Nesse contexto, provavelmente, a elevada imunogenicidade e imunodominância de algumas moléculas de superfície, que teoricamente são os principais produtos de excreção/secreção, podem responder pela maior reatividade aos antígenos ES desses tripanosomatídeos patogênicos. Nossos experimentos com anticorpos eluídos de *pool* de soros de pacientes com LV mostraram, como era de se esperar, que existe certa identidade de epitopos entre ES e ET de *L. seymouri* (Figura 18 A e B) bem como entre ES de *L. (L.) chagasi* e ET de *L. seymouri* (Figura 18 C). Menor relacionamento foi observado entre ES de *L. seymouri* e ES de *L. (L.) chagasi*. É importante frisar que esses experimentos refletem a reatividade de eluatos obtidos de um pool de apenas 3 diferentes soros de LV. De qualquer forma para caracterizar melhor essa identidade são precisos novos experimentos com diferentes eluatos, além da utilização de outras abordagens como por exemplo experimentos de absorção cruzada (Umezawa et al., 2001), que devido a dificuldades técnicas não pudemos realizar com todos os antígenos. Todavia experimentos de absorção cruzada realizados apenas com antígenos ES, mostraram que ES de *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi* compartilham cerca de 53%-62% dos epitopos.

Quando as moléculas imunorreativas de ES *L. seymouri* foram avaliadas por immunoblotting foi surpreendente a discrepância de reatividade em relação ao ELISA, principalmente devido à falta de reatividade com soro de LV (Figuras 11B, 12B, 12B', 13B, linhas 2 e 3 e 21A, linha 3). Em contrapartida, intensa reatividade, foi observada com soros de CH (Figuras 11A; 12A; 13A linhas 2 e 3; 21A, linha 1 e 2). Todavia a reatividade de soros de CH com ES de *L. seymouri* não era homogênea visto ser específica para cada paciente, em alguns casos era ausente ou apresentava-se com pouca intensidade (Figura 21B, linha 3). Essa discrepância de reatividade de acordo com a técnica empregada nos levou a questionar se a desnaturação que ocorre no immunoblotting poderia de certa forma ter afetado

conformações antigênicas determinantes do ES para a ligação ao anticorpo. Todavia a reatividade de ES de *L. seymouri* com soros de LV permaneceu baixa ou ausente, mesmo após immunoblotting em condições não desnaturantes (Figuras 12 B e B'). O fato é que de acordo com preparado antigênico de *L. seymouri* o immunoblotting favoreceu a reatividade de soros CH em detrimento da reatividade de soros de LV. Reatividade elevada foi observada tanto para soro de LV (Figuras 13B, linha1; 14A, linha1 e 21A, linha1) como para CH (Figuras 13A, linha1; 14B, linha 1 e 21B, linha1) quando se utilizou como controle parasito total lisado mostrando de forma geral a elevada similaridade antigênica entre *L. seymouri* e os tripanosomatídeos patogênicos.

A análise por ELISA da reatividade dos casos de CH mostrou positividade de 100% apenas com os antígenos homólogos ES-ET de *T. cruzi* (Tabela 5). O preparado antigênico ET de *L. seymouri* apresentou positividade 94,7% e elevada média de reatividade (Tabela 5, Figura 8), porém menor do que a observada com soros de LV (Tabela 2, Figura 5) Esses dados demonstram que por ELISA é possível evidenciar melhor a identidade antigênica entre *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi* do que *L. seymouri* e *T. cruzi*. Essa teoria fica mais fortalecida quando comparamos a reatividade entre ET-ES de *L. seymouri* com soros chagásicos (Tabela 5, Figura 8). A baixa positividade (30%) de ES de *L. seymouri* com soros chagásicos com baixa média, denota que moléculas excretadas-secretadas por esse tripanosomatídeo parecem ter maior similaridade antigênica a *L. (L.) chagasi*.

Determinar quais as moléculas antigênicas comuns ou similares que poderiam explicar essa reatividade é uma tarefa árdua e pouco investigada na literatura. Dentre os possíveis candidatos encontram-se as metaloproteínases, como por exemplo, a GP63. Conforme já abordado, a GP63 foi descrita em promastigotas de *Leishmania* sp como a mais abundante glicoproteína ancorada a membrana (Etges et al.,1986; Medina-Acosta e Beverley e Russell, 1993;

Brittingham et al., 1995; Hsiao et al., 2008; Santos et al., 2006). A GP63 também é reconhecida por soro de pacientes com LV (Shreffler et al., 1993; Okong`O-Dera et al., 1993; Atta et al., 2004) e apresenta papel fundamental na relação patógeno-hospedeiro (Hsiao et al., 2008; Santos et al., 2006).

Estudos descreveram homólogos dessa metaloproteínase em vários tripanosomatídeos que infectam insetos e plantas, entre eles a *C. fasciculata*, *C. luciliae*, *C. deanei*, *C. guilhermei*, *H. samuel pessoai*, *P. serpens* e *P. françai* e o próprio *L. seymouri*, (Etges, 1992; Inverso et al., 1993; Jaffe e Dwyer, 2003; D'Avila-Levy et al., 2006; Santos et al., 2006). Localizada em domínios de membrana e compartimentos internos celulares em *P. serpens* (Elias et al., 2012) foi demonstrado também sua presença no sobrenadante de meio de cultivo em *H. samuel pessoai* (Elias et al., 2006), *C. luciliae*, *L. seymouri* e *L. donovani* (Jaffe e Dwyer, 2003). Curiosamente o trabalho de Jaffe e Dwyer et al., (2003) mostrou que *L. seymouri* excreta-secreta para o meio de cultivo proteases que bandeiam na região entre 45 e 97 kDa e apresentam características bioquímicas e imunológicas idênticas a GP63 de *L. (L.) chagasi*.

Nossos experimentos mostraram que ES de *L. seymouri* apresenta bandas em gel contendo gelatina com intensa atividade proteolítica na região de peso molecular entre 50 e 116 kDa quando a amostra de ES foi concentrada em 40 vezes (Figura 10, linha 4). Todavia, não conseguimos comprovar que esta molécula poderia estar presente em nossa preparação antigênica com imunogenicidade pela falta de anticorpo monoclonal anti GP63. De qualquer forma vale reiterar a reatividade fraca ou muitas vezes ausente, em immunoblotting, dos soros de LV com ES de *L. seymouri*.

Outra possível candidata é a amastina. Essa proteína foi descrita em amastigotas do gênero *Leishmania* (Rochette et al., 2005) com elevada similaridade a amastina de *T. cruzi* (Teixeira et al., 1994). Genes que codificam essa proteína

estão presentes em *Crithidia sp* e *L. seymouri* (Andrew, 2010). A amastina é uma proteína imunogênica e foi postulada como um importante antígeno para o imunodiagnóstico da LV (Rafati et al., 2006).

Independente de qual seja a molécula, proteínas presentes nos preparados antigênicos de *L. seymouri* parecem ser as principais responsáveis pela imunorreatividade cruzada com soros de LV, já que a digestão química dos antígenos com proteínase K diminuiu drasticamente a reatividade para ES (Figura 15A) e ET de *L. seymouri* (Figura 16A). A identificação específica de cada molécula é uma tarefa muito difícil, devido a grande diversidade de moléculas protéicas que podem participar de tal processo. Do mesmo modo, não podemos descartar epítopos glicídios de glicoproteínas e glicoconjugados que em menor proporção também poderiam contribuir para tal reatividade, como visto para ES (Figura 15A) e ET de *L. seymouri* (Figura 16A). Por outro lado a reatividade para soros CH mostrou-se diferencial entre os preparados antigênicos de *L. seymouri* e a técnica empregada na análise. Soros de CH reagem preferencialmente com epítopos de carboidratos presentes no ES (Figuras 15B, 17A) e epítopos protéicos presentes no ET (Figuras 16B, 17B).

A literatura descreveu a presença de epítopos de carboidrato Gal- α (1,3) gal em diferentes “tripanosomatídeos inferiores” (Gazzinelli et al., 1991) que poderiam estar contribuindo para tal reatividade. Este autor mostrou que alguns tripanosomatídeos de insetos apresentam cerca de oito vezes mais epítopos Gal- α (1,3) gal na sua superfície comparado a *Leishmania sp.* e *T. cruzi*. Epítopos Gal- α (1,3) gal presentes em bactérias da flora intestinal estimulam continuamente a produção de anticorpos anti-Gal, que perfazem 1% das IgGs totais no humano. Este epítopo está ausente no homem e nos primatas não humanos do Velho Mundo, conseqüentemente estes produzem níveis elevados de anticorpos anti-Gal quando estimulados por agentes que possuam este epítopo (Avila et al., 1991;

Galili et al., 1984; Rother e Squinto, 1996). Todavia a hipótese da participação dessa molécula influenciando a reatividade cruzada diminuiu devido a experimentos preliminares que mostraram que soros de cães que não produzem anticorpo anti-Gal, infectados com *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi* reagem de modo similar aos dos pacientes (dados não mostrados).

Diferente do ES, conforme já citado, a reatividade de ET de *L. seymouri* com soros de CH está relacionada mais diretamente a epitopos protéicos (Figuras 16B, 17B). A análise por Immunoblotting mostrou elevada imunorreatividade para a região de peso molecular entre 29-36 kDa em 100% dos soros CH testados. Essa reatividade permaneceu inalterada mesmo após o tratamento do antígeno com NaIO₄ (Figura 17B). Excepcionalmente um soro de CH de fase aguda, obtido de um paciente com infecção recente não reagiu com bandas desta região (Figura 22A, linha 10), o que nos permite pensar que no início da Doença Chagas o estímulo humoral para este antígeno é baixo, uma vez que outra amostra de soro de um paciente chagásico também de fase aguda mais tardia reagiu com bandas nesta região (Figura 22 A, linha 9). A baixa ou ausência de reatividade para essa região de soros de LV (Figura 22 B linhas de 1 a 7) e LT (Figura 22 B linhas de 1 a 4) e ausência completa de reatividade de soros de outras doenças e indivíduos saudáveis (Figura 22 B linhas de 1 e 2) permite-nos destacar o potencial desse antígeno para detecção de casos de pacientes com Doença de Chagas por immunoblotting. De certo modo, nossos dados corroboram com os de Monteon et al.(1997) que encontrou, por immunoblotting com extrato antigênico total de *C. luciliae*, 100% de reatividade de soros chagásicos com uma banda proteica de 30kDa. Esse autor sugere o uso da *C. luciliae* para o imunodiagnóstico da Doença de Chagas.

Novamente as proteases, as moléculas mais bem estudadas em tripanosomatídeos de insetos e plantas podem ser candidatas à reatividade cruzada

com soros de CH. Estudos mostram a presença de cisteíno-proteases homólogas a cruzipaina de *T. cruzi* (Cazzulo et al., 2001) em tripanosomatídeos como *Blastocrithidia culicis* (d'Avila-Levy et al., 2005) e *P. serpens* (Santos et al., 2006a). Essa molécula também é encontrada em produtos de excreção-secreção de *P. serpens* (Elias et al., 2008) e são reconhecidas por soros de chagásicos (Elias et al., 2009). De fato, estudo de Bregano et al., (2003) já demonstrava a elevada reatividade cruzada de soros de chagásicos com antígeno de *P. serpens*. De qualquer forma, na literatura, não existem relatos similares com *L. seymouri*.

Além das proteases, outras classes de moléculas como os lipopeptidofosfoglicanos (LPPGs) e os glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs tipos 1 e 2), provavelmente presentes na preparação antigênica ET, podem estar envolvidas.

Nossos resultados mostraram que anticorpos anti LPPG purificados de soros chagásicos reagem com *L. (L.) chagasi* e principalmente com ET de *L. seymouri* (Figura 20). Os LPPGs, são glicoconjugados de membrana, estão presentes em *T. cruzi* e são capazes de induzir a produção de altos níveis de anticorpos específicos, na fase aguda da Doença de Chagas (Umezawa et al., 1996b). Esta molécula apresenta duas características que a torna altamente imunogênica: sua localização na superfície e a presença de uma galactofuranose terminal (De Lederkremer et al., 1991, 1995; Golgher et al., 1993). A galactofuranose é altamente imunogênica por não estar presente nos vertebrados (Beverley et al., 2005). Essa molécula foi descrita em *Leishmania* sp (De Lederkremer, 1995), *C. fasciculata*, *C. hamosa* (Mendelzon e Parodi, 1986), *L. samueli* e *H. samuel pessoai* (Moraes et al., 1988).

Os GIPLs, são moléculas de membrana que não são ligadas a polissacarídeos ou proteínas e estão presentes em *Leishmania* sp. e *T. cruzi* (Avila et al., 1991). Estas moléculas são imunogênicas e também foram descritas em *Herpetomonas* sp, *Leptomonas* sp, e *Crithidia* sp (Routier et al., 1993, 1995). Alguns trabalhos mostram

que existem elevados níveis de expressão de GIPLS tipo 2, ancorando moléculas de superfície, em *Crithidia sp*, *Leptomonas sp*, nas LPGS de *L. (L.) chagasi* (Ferguson et al., 1997), *L. samueli* (Previanto et al., 1992), *H. samuel pessoai* (Routier et al., 1995) e *C. fasciculata* (Schneider et al., 1996) enquanto que GIPLS do tipo 1 estão presentes em abundância em *T. cruzi* e *P. serpens* (Redman et al., 1995).

Provavelmente, o repertório de moléculas comuns ou similares que podem provocar imunorreatividade cruzada entre esses tripanosomatídeos é imenso. É possível que um conjunto dessas moléculas, algumas mais, outras menos, devem participar de forma efetiva nesse processo. Um exemplo disso é a reatividade do anticorpo monoclonal anti Ssp4, uma proteína de superfície de amastigotas de *T. cruzi*, com ES-ET de *L. seymouri* e ET de *L. (L.) chagasi*. Assim como soro hiperimune anti *L. (L.) amazonensis* que reage com ES-ET de *L. (L.) chagasi* e ET de *L. seymouri* (Figura 20). A não reatividade do soro anti *L. amazonensis*, agente etiológico da leishmaniose cutânea, com ES de *L. seymouri* corrobora com nossos dados que mostram que esse antígeno não é reconhecido por anticorpos presente nos soros de pacientes com leishmaniose tegumentar (Fig. 7, tabela 4). O soro hiperimune anti *L. seymouri* reconhece especificamente os preparados antigênicos de *L. seymouri*, reatividade esta que foi completamente abolida após o tratamento do antígeno com NaIO_4 (dados não mostrados).

Baixa reatividade para soros de CH também foi observada com ES de *L. (L.) chagasi*, diferentemente do obtido com ET (Figura 8). Antígenos secretados-excretados por *L. (L.) chagasi* também são motivos de estudo de nosso grupo e mostraram-se promissores para o imunodiagnóstico da LV humana e canina. Aplicados em testes de imunodiagnóstico apresentam elevada sensibilidade e especificidade para os casos de LV.

Apenas a reatividade com os preparados antigênicos de *C. deanei* se mostrou homogênea entre ES e ET, e de qualquer forma com baixas médias

quando comparada a ET de *L. seymouri*, conforme havia sido observado com os soros de LV. Devido a esse fato, focamos nosso estudo na reatividade com *L. seymouri* que se mostrou muito mais promissora como um antígeno alternativo para o imunodiagnóstico da LV e CH. Um fato que poderia explicar a preferencial imunorreatividade cruzada entre *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi* poderia estar relacionada a maior proximidade filogenética entre eles (Fernandes et al., 1993). A classificação filogenética evolutiva dos tripanosomatídeos é complexa e depende basicamente da metodologia empregada em cada estudo (Simpson et al., 2002). Contudo, a teoria da semelhança antigênica relacionada com a proximidade evolutiva, pode ser corroborada com os dados descritos por Fernandes et al. (1993). Utilizando marcador molecular (SSU-rRNA) o autor mostrou que parasitos dos gêneros *Crithidia*, *Leptomonas* e *Leishmania* formam um grupo relacionado e mais distante filogeneticamente de *Phytomonas* sp e *T. cruzi* e que estes últimos estariam mais relacionados entre si do que com o gênero *Leishmania*. Para comprovar tal hipótese seria necessária a utilização de um número maior de parasitos de insetos com relações filogenéticas bem definidas entre eles e com *L. (L.) chagasi* e *T. cruzi*. Por outro lado, vale ressaltar que a *C. deanei*, independentemente da preparação antigênica, apresentou baixa imunorreatividade cruzada com soros LV, diferente do observado anteriormente por nosso grupo com outras espécies do gênero *Crithidia*. O fato de pertencerem a um mesmo gênero, não implica necessariamente em maior similaridade molecular ou biológica (Yurchenko et al., 2008). Além da carga genética, o desenvolvimento evolutivo de cada espécie e as relações com meio ambiente tem importância crucial para suas características fenotípicas.

A análise da imunorreatividade cruzada nos casos dos pacientes com LT (cutânea e mucocutânea) mostrou que as maiores positivities 69,5% foram obtidas em ET de *L. seymouri* e *L. (L.) chagasi* (Figura 7, Tabela 4). Apesar da

elevada imunorreatividade cruzada apresentada com soros LV, ES de *L. seymouri* não foi reconhecido por nenhum soro de LT. De fato moléculas presentes no ES de *L. seymouri* parecem ter maior especificidade a *L. (L.) chagasi*, e não são compartilhadas nos casos de LT com ET de *L. seymouri* e ET de *L. (L.) chagasi*. Um dado muito interessante foi a ausência ou baixa reatividade cruzada observada com o ES de todos os tripanosomatídeos, inclusive *L. (L.) chagasi* e soros de LT. Todavia dois trabalhos reportaram respectivamente que 80-92,3% e 71% dos soros de pacientes com leishmaniose cutânea foram reativos com antígenos excretados-secretados obtidos de *L. (L.) mexicana* e *L. (V) braziliensis* (Ryan et al., 2002; Romero et al., 2004).

Outro fato a ser considerado é a baixa e heterogênea produção de anticorpos que ocorre durante o curso da LT (cutânea e mucocutânea) o que limita o uso testes sorológicos para o diagnóstico dessa doença. Deste modo o diagnóstico dos pacientes com LT, se faz com técnicas baseadas na identificação da resposta imune celular (David e Craft, 2009; Goto e Lindoso, 2010).

Nenhuma amostra de pacientes portadores de outras doenças parasitárias e auto-imunes foram reativos com ES-ET dos tripanosomatídeos testados (Figura 9). A reatividade inespecífica estimulada por agentes infecciosos ou doenças auto-imunes no diagnóstico da leishmaniose ou Doença de Chagas é fato conhecido (Vexenat et al., 1996; Gontijo e Melo, 2004;). Alguns autores sugerem que a ingestão de alimentos, como por exemplo tomate contendo *P. serpens* poderia induzir uma resposta humoral comprometendo a especificidade do diagnóstico da Doença de Chagas (Breganó et al., 2003).

Especificamente para soros de pacientes com doenças auto-imunes era de se esperar alguma reatividade inespecífica, visto que, os tripanosomatídeos possuem cinetoplasto com DNA muito bem condensado, livre de proteínas associadas e por isso são utilizados, no caso da *C. luciliae*, como antígeno para a

detecção de anticorpos anti núcleo (FAN) em indivíduos portadores por exemplo de Lúpus Eritematoso Sistêmico (Aarden et al., 1975; Fisher-Smikle et al., 1987; Nilsson e Biberfeld, 1980; Slater et al., 1976). Entretanto nenhuma reatividade foi observada.

Por fim, os dados obtidos com este estudo demonstram que o fenômeno da imunorreatividade cruzada é dependente do tripanosomatídeo, tipo de antígeno e metodologia de análise. De qualquer forma nossos resultados mostraram principalmente o potencial de ES e ET de *L. seymouri* como fonte alternativa para o imunodiagnóstico de rotina da LV. A facilidade e o baixo custo de cultivo aliado a ausência de risco para o técnico reforçam a utilidade desses antígenos. Contudo um maior investimento na investigação de moléculas imunorreativas, principalmente as presentes no ES, poderia indicar antígenos com capacidade discriminatória e produzir teste com maior especificidade.

7 CONCLUSÕES

O elevado reconhecimento de antígenos de *L. seymouri* por soros de pacientes com Leishmaniose e a maior sensibilidade do ET para detecção de soros de LV com baixa reatividade para o antígeno homólogo ET de *L. (L.) chagasi* visceral sugere seu uso como antígeno alternativo no imunodiagnóstico da leishmaniose visceral .

A imunorreatividade foi dependente da espécie de tripanosomatídeo, forma de obtenção do antígeno e metodologia de avaliação.

Antígenos de *C. deanei* apresentaram menor reatividade cruzada que os de *L. seymouri*, quando testados com soros de pacientes de Doença de Chagas ou Leishmaniose visceral.

Antígenos excretados e secretados de *L. seymouri* e *C. deanei* são pouco reconhecidos por soros de pacientes com doença de Chagas e não são reconhecidos por soros de pacientes com leishmaniose cutânea.

A reatividade dos antígenos excretados-secretados de *L. seymouri* por soros de chagásicos é devida a carboidratos, que não ocorre com o antígeno total.

O reconhecimento dos antígenos secretados por soros de pacientes com leishmaniose visceral é devido a associação de epitopos protéicos e de carboidratos.

A elevada imunorreatividade de ET com soros de CH por imunoblotting potencializa sua utilização como antígeno alternativo para o imunodiagnóstico da doença de Chagasi

Falar do identidade

REFERENCIAS

Aarden LA, De Groot ER, Feltkamp TE. Immunology of DNA. III. *Crithidia luciliae*, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. Ann NY Acad Sci. 1975;254: 505-15.

Acosta-Serrano A, Almeida IC, Freitas-Junior LH, Yoshida N, Schenkman S. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. Mol Biochem Parasitol. 2001;14:43-50.

Agüero F, Campo V, Cremona L, Jäger A, Di Noia JM, Overath P, et al. Gene discovery in the freshwater fish parasite *Trypanosoma carassii*: identification of trans-sialidase-like and mucin-like genes. Infect Immun. 2002;70:7140-4.

Alfieri SC, Shaw E, Zilberfarb V, Rabinovitch M. *Leishmania amazonensis*: involvement of cysteine proteinases in the killing of isolated amastigotes by L-leucine methyl ester. Exp Parasitol. 1989;68:423-31.

Almeida IC, Ferguson MAJ, Schenkman S, Travassos LR. Litic anti- α -galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucina-like glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. Biochem J. 1994a;304:793-802.

Almeida IC, Gazzinelli RT. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. J Leukoc Biol. 2001;70:467-77.

Andrew P. Jackson. The Evolution of Amastin Surface Glycoproteins in Trypanosomatid Parasites. Mol Biol Evol. 2010;27:33–45.

Andrews NW, Hong KS, Robbins ES, Nussenzweig V. Stage-specific surface antigen expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 1987;64:474-84.

Atta AM, Colossi R, Sousa-Atta ML, Jeronimo SM, Nascimento MD, Bezerra GF, et al. Antileishmanial IgG and IgE antibodies recognize predominantly carbohydrate epitopes of glycosylated antigens in visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99: 525-30.

Avila JL, 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.* 1991;29:2305-12.

Branquinha MH, Vermelho AB, Goldenberg S, Bonaldo MC. Ubiquity of cysteine- and metalloproteinase activities in a wide range of trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol.* 1996;43:131-5.

Breganó J W, Picão RC, Graça VL, Menolli RA, Itow JS, et al. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;39:257-64.

Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol.* 1995;155:3102-11.

Camargo EP. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasitol.* 1999;42:29-112.

Camargo ME, Rebonato C. Cross-reactivity in fluorescence test for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *Amer J Trop Med Hyg.* 1969;18:500-5.

Camargo ME, Rebonato C. Cross-reactivity in immunofluorescence test for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *Am J Trop Med Hyg.* 1969;18:500-5.

Castellani O, Ribeiro LV, Fernandes JF. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J. Protozool.* 1967;14:447-51.

Chicharro C, Alvar J. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003;97(Suppl 1):75-8.

Cibrelus P, Précigout E, Sereno D, Carcy B, Lemeres JL, Gorenflot A. Secreted antigens of amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum* inducing a humoral response in humans and dogs. *Parasite.* 1999;6:121-9.

Comini M, Menge U, Wissing J, Flohe L. Trypanothione synthesis in *Crithidia* revisited. *J Biol Chem.* 2005;280:6850–6860.

D'Avila-Levy CM, Araújo FM, Vermelho AB, Soares RM, Santos AL, Branquinha MH. Proteolytic expression in *Blastocrithidia culicis*: influence of the endosymbiont and similarities with virulence factors of pathogenic trypanosomatids. *Parasitology*. 2005;130:413-20.

D'Avila-Levy CM, Melo AC, Vermelho AB, Branquinha MH. Differential expression of proteolytic enzymes in endosymbiont-harboring *Crithidia* species. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;202:73-7.

d'Avila-Levy CM, Souza RF, Gomes RC, Vermelho AB, Branquinha MH. A metalloproteinase extracellularly released by *Crithidia deanei*. *Can J Microbiol*. 2003;49:625-32.

Daggett PM, Dollahon N and J. Janovy Jr J. *Herpetomonas megaseliae* sp. n. (Protozoa: Trypanosomatidae) from *Megaselia scalaris* (Loew, 1966) Schmitz, 1929 (Diptera: Phoridae) J. Parasitol. 1972;58:946-9.

De Lederkremer RM, Alves MJ, Fonseca GC, Colli W. A lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* (epimastigote). Isolation, purification and carbohydrate composition. *Biochim Biophys Acta*. 1976;444:85-96.

De Lederkremer RM, Lima C, Ramirez MI, Ferguson MA, Homans SW, Thomas-Oates, J. Complete structure of the glycan of lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. *J Biol Chem*. 1991;266:23670-5.

Dollet M. Plant diseases caused by flagellate Protozoa (Phytomonas). *Ann Rev Phytopathol*. 1984;22:115-132.

Dos Santos AL, Abreu CM, Alviano CS, Soares RM. Activation of the glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteinases upon release from *Herpetomonas samuelpessoai* by phospholipase C. *Curr Microbiol*. 2002;45:293-8.

Elias CG, Aor AC, Valle RS, D'Avila-Levy CM, Branquinha MH, Santos AL. Cysteine peptidases from *Phytomonas serpens*: biochemical and immunological approaches. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009;57:247-56.

Elias CG, Pereira FM, Silva BA, Alviano CS, Soares RM, Santos AL. Leishmanolysin (gp63 metalloproteinase)-like activity extracellularly released by *Herpetomonas samuelpessoai*. *Parasitology*. 2006;132:37-47.

Etges R, Bouvier J, Bordier C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J Biol Chem*. 1986;261:9098-101.

Etges R, Bouvier J, Bordier C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J Biol Chem*. 1986;15:9098-101.

Ferguson MA. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci*. 1999;112:2799-809.

Ferguson MA. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1997;352:1295-302.

Fisher-Smikle M, James OB. Diagnosis of systemic lupus erythematosus in Jamaica by *Crithidia luciliae* indirect immunofluorescence test. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81:255-6.

Flohé L. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. *Biotechnol Adv*. 2012;30:294-301.

Fong D, Chang KP. Changes in tubulin mRNAs during differentiation of a parasitic protozoan *Leishmania mexicana*. *Ann N Y Acad Sci*. 1986;466:129-31.

Frasch ACC. Functional diversity in the *trans*-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 2000;16:282-6.

Freire-de-Lima CG, Nunes MP, Corte-Real S, Soares MP, Previato JO, Mendonça-Previato L, et al. Proapoptotic activity of a *Trypanosoma cruzi* ceramide-containing glycolipid turned on in host macrophages by IFN-gamma. *J Immunol*. 1998;161:4909-16.

Galili U, Rachmilewitz EA, Peleg A, Flechner I. A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *J Exp Med*. 1984;160:1519-31.

Gazzinelli RT, Romanha AJ, 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*. 1991;38:320-5.

Ghosh S, Banerjee P, Sarkar A, Datta S, Chatterjee M. Coinfection of *Leptomonas seymouri* and *Leishmania donovani* in Indian leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2774-8.

Goldberg B, Lambros C, Bacchi CJ, Hutner SH. Inhibition by several standard antiprotozoal drugs of growth and O₂ uptake of cells and particulate preparations of a *Leptomonas*. *J Protozool*. 1974;21:322-6.

Golgher DB, Colli W, Souto-Padrón T, Zingales B. Galactofuranose-containing glycoconjugates of epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1993;60:249-64.

Gomes NA, Previato JO, Zingales B, Mendonça-Previato L, DosReis.GA. Down-regulation of T lymphocyte activation in vitro and in vivo induced by glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi*: assignment of the T cell suppressive determinant to the ceramide domain. J Immunol. 1996;156:628-35.

Gonçalves CC, ReicheEM, De Abreu Filho BA, Silveira TG, Felizardo TC, Maia KR, et al. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a Western blot for diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis. Am J Trp Med Hyg. 2002;66:91-102.

Graça-de Souza VK, Monteiro-Góes V, Manque P, Souza TA, Corrêa PR, Buck GA, et al. Sera of chagasic patients react with antigens from the tomato parasite *Phytomonas serpens*. Biol Res. 2010;43:233-41.

Hedge EC, Moody AH, Ridley DS. An easily cultured *Crithidia* sp. as antigen for immunofluorescence for kala-azar. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1978;72:445.

Howard MK, Pharoah MM, Ashall F, Miles MA. Human urine stimulates growth of *Leishmania* in vitro. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1991;85:477-9.

Hsiao CH, Yao C, Storlie P, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi*. Mol Biochem Parasitol. 2008;157:148-59.

Ilgoutz SC, McConville MJ. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. Int J Parasitol. 2001;31:899-908.

Jaffe C L, Dwyer DM. Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. Parasitol Res. 2003;91:229-237.

Jansen AM, Carreira JC, Deane MP. Infection of a mammal by monogenetic insect trypanosomatids (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988;83:271-2.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970;227:680-5.

Lopes JD, Caulada Z, Barbieri CL, Camargo EP. Cross-reactivity between *Trypanosoma cruzi* and insect trypanosomatids as a basis for the diagnosis of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1981;30:1183-8.

Lopez-Brea M, Iturriaga R, Aparicio M. Early serological diagnosis in visceral leishmaniasis using *Crithidia* sp. as antigen. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1979;73:348.

Malchiodi EL, Chiamonte MG, Taranto NJ, Zwirner NW, Margni RA. 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.* 1994;97:417-23.

Marcipar IS, Roodveldt C, Corradi G, Cabeza ML, Brito ME, Winter LM, et al. Use of full-length recombinant calflagin and its C fragment for improvement of diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5498-503.

Marcipar IS, Roodveldt C, Corradi G, Cabeza ML, Brito MEF, Floeter LMW, et al. Use of Full-Length Recombinant Calflagin and Its C Fragment for Improvement of Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5498-503.

Martin SK, Thuita-Harun L, Adoyo-Adoyo M, Wasunna KM. A diagnostic ELISA for visceral leishmaniasis, based on antigen from media conditioned by *Leishmania donovani* promastigotes. *Ann Trop Med Parasitol.* 1998;92:571-7.

Martinkovic F, Marinculic A. Antibodies against *Leishmania* cross-react with *Crithidia luciliae*: indirect immunofluorescence and Dot-ELISA study in dogs. *Parasitol Res.* 2006;98:378-80.

McConville MJ, Collidge TA, Ferguson MA, Schneider P. The glycoinositol phospholipids of *Leishmania mexicana* promastigotes. Evidence for the presence of three distinct pathways of glycolipid biosynthesis. *J Biol Chem.* 1993;268:15595-604.

McConville MJ, Ferguson MA. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J.* 1993;294:305-24.

McConville MJ, Schnur LF, Jaffe C, Schneider P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. *Biochem J.* 1995;310:807-18

McGhee RB, Cosgrove WB. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiol Rev.* 1980;44:140-73.

McGhee RB. The infection of avian embryos with *Crithidia* species and *Leishmania tarentola*. *J Infect Dis.* 1959;105:18-25.

Medina-Acosta E, Beverley SM, Russell DG. Evolution and expression of the *Leishmania* surface proteinase (gp63) gene locus. *Infect Agents Dis.* 1993;1:25-34.

Mendelzon DH, Parodi AJ. N-linked high mannose-type oligosaccharides in the protozoa *Crithidia fasciculata* and *Crithidia hamosa* contain galactofuranose residues. *J Biol Chem.* 1986;261:2129-33.

Monteón VM, Guzmán-Rojas L, Negrete-García C, Rosales-Encina JL, Lopez PA. Serodiagnosis of american trypanosomiasis by using nonpathogenic trypanosomatid antigen. *J Clin Microbiol.* 1997;35:3316-9.

Moody SF, Handman E, McConville MJ, Bacic A. The structure of *Leishmania* major amastigote lipophosphoglycan. *J Biol Chem.* 1993;268:18457-66.

Moraes CT, Bosch M, Parodi AJ. Structural characterization of several galactofuranose-containing, high-mannose-type oligosaccharides present in glycoproteins of the trypanosomatid *Leptomonas samueli*. *Biochemistry.* 1988;27:1543-9.

Morio F, Reynes J, Dollet M, Pratlong F, Dedet JP, 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.* 2008;46:3845-7.

Nilsson E, Biberfeld G. Demonstration of antibodies to double-stranded DNA by the *Crithidia luciliae* immunofluorescence test. *J Clin Lab Immunol.* 1980;3:197-201.

Okong'o-Odera EA, Kurtzhals JA, Hey AS, Kharazmi A. Measurement of serum antibodies against native *Leishmania* gp63 distinguishes between ongoing and previous *L. donovani* infection. *APMIS.* 1993;101:642-6.

Pimenta PFP, Saraiva EMB, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley SM, et al. 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.* 1994;91:9155-9.

Pinge-Filho P, Peron JP, de Moura TR, Menolli RA, Graça VK, Estevão D, et al. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide. *Immunol Lett*. 2005;96:283-90.

Podlipaev SA. Insect trypanosomatids: the need to know more. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95:517-22.

Previato JO, Jones C, Goncalves LP, Wait R, Travassos LR, Mendonça-Previato L. O-glycosidically linked N-acetylglucosamine-bound oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. 1994;301:151-9.

Previato JO, Mendonça-Previato L, Jones C, Fournet B. Structural characterization of a novel class of glycopospholipids from the protozoan *Leptomonas samueli*. *J Biol Chem*. 1992;267:24279-86.

Previato JO, Wait R, Jones C, Dos-Reis GA, Todeschini AR, Heise N, et al. Glycoinositolphospholipid from *Trypanosoma cruzi*: structure, biosynthesis and immunobiology. *Adv Parasitol*. 2004;56:1-41.

Rafati S, Hassani N, Taslimi Y, Movassagh H, Rochette A, Papadopoulou B. Amastin peptide-binding antibodies as biomarkers of active human visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13:1104-10.

Redman CA, Schneider P, Mehlert A, Ferguson MA. The glycoinositolphospholipids of *Phytomonas*. *Biochem J*. 1995;311:495-503.

Rochette A, Mc Nicoll F, Girard J, Breton M, Leblanc EG, Bergeron MG, et al. Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. *Mol Biochem Parasitol* 2005;140:205-20.

Rochette A, McNicoll F, Girard J, Breton M, Leblanc E, Bergeron MG, et al. Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. *Mol Biochem Parasitol*. 2005;140:205-20.

Rother RP, Squinto SP. The alpha-galactosyl epitope: a sugar coating that makes viruses and cells unpalatable. *Cell*. 1996;86:185-8.

Routier F, Previato JO, 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*. 1993;45:60-8.

Routier FH, Da Silveira EX, Wait R, Jones C, Previato JO, Mendonça-Previato L. Chemical characterisation of glycosylinositolphospholipids of *Herpetomonas samuelpeessoai*. *Molec Biochem Parasitol*. 1995;69:81-92.

Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Ann Rev Microbiol.* 2001;55:453-83.

Santos AL, Branquinha MH, D'Avila-Levy CM. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. *An Acad Bras Ciênc.* 2006;78:687-714.

Santos AL, d'Avila-Levy CM, Dias FA, Ribeiro RO, Pereira FM, Elias CG, et al. *Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion. *Int J Parasitol.* 2006a;36:47-56.

Santos DO, Bourguignon SC, Castro HC, Silva JS, Franco LS, Hespanhol R, et al. Infection of mouse dermal fibroblasts by the monoxenous trypanosomatid protozoa *Crithidia deanei* and *Herpetomonas roitmani*. *J Eukaryot Microbiol.* 2004;51:570-4.

Schenkman S, Eichinger D, Pereira MEA, Nussenzweig V. Structural and functional properties of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Annu Rev Microbiol.* 1994a;48:499-523.

Schenkman S, Eichinger D. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. *Parasitol Today.* 1993;9:218-22.

Schenkman S, Ferguson MA, Heise N, Cardoso de Almeida ML, Mortara RA, Yoshida N. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1993a;59:293-304.

Schenkman S, Dias C, Nussenzweig V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. *Exp Parasitol.* 1991;2: 76-86.

Schmuñis GA, Szarfman A, Langembach T, De Souza W. Induction of capping in blood-stage trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* by human anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies. *Infect Immun.* 1978;20:567-9.

Schneider P, Glasser TA. Characterization of a surface metalloprotease from *Herpetomonas samuelpessoai* and comparison with *Leishmania major* promastigote surface protease. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;58:277-82.

Schneider P, Treumann A, Milne KG, McConville MJ, Zitzmann N, Ferguson MA. Structural studies on a lipoarabinogalactan of *Crithidia fasciculata*. *Biochem J.* 1996;313:963-71.

Shreffler WG, Burns JM, Badaró R, Ghalib HW, Button LL, McMaster WR, et al. Antibody responses of visceral leishmaniasis patients to gp63, a major surface glycoprotein of *Leishmania* species. *J Infect Dis.* 1993;167:426-30.

Simpson AG, Lukes J, Roger AJ. The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. *Mol Biol Evol.* 2002;19:2071-83.

Slater NG, Cameron JS, Lessof MH. The *Crithidia lucillae* kinetoplast immunofluorescence test in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 1976;25: 480-96.

Souza MCM, Reis AP, Silva WD, Brener Z. Mechanism of acquired immunity induced by "*Leptomonas pessoai*" against *Trypanosoma cruzi* in mice. *J Protozool.* 1974;21:579-584.

Souza MS, Mizuta K, Ikemoto H. In vitro exoantigen from *Herpetomonas samuelpessoai* which protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1980;22:184-91.

Teixeira MMG, Serrano MG, Campaner M, Camargo EP. PCR amplification of the spliced leader gene for the diagnosis of trypanosomatid parasites of plants and insects in methanol-fixed smears. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;176:241-6.

Teixeira SM, Russell DG, Kirchhoff LV, Donelson JE. A differentially expressed gene family encoding "amastin," a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *J Biol Chem.* 1994;269:20509-16.

Teixeira SM, Russell DG, Kirchhoff LV, Donelson JE. A differentially expressed gene family encoding "amastin," a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *J Biol Chem.* 1994;269:20509-16.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76:4350-4.

Turco SJ, Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol.* 1992;46:65-94.

Turco SJ, Spath GF, Beverley SM. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania*. *Trends Parasitol.* 2001;17:223-6.

Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N Jr, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira ACV, et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute and chronic Chagas' disease. J Clin Microbiol. 1996;**34**:2143-7.

Umezawa ES, Nascimento MS, Stolf AM. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. Diagn Microbiol Infect Dis. 2001;**39**:169-76

Umezawa ES, Shikanai-Yasuda MA, Stolf AM. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti- *Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas disease. J. Clin. Lab. Anal. 1996b;**10**:407-13.

Vattuone NH, Yanovsky JF. *Trypanosoma cruzi*: agglutination activity of enzyme-treated epimastigotes. Exp Parasitol. 1971;**30**:349-55.

Vermelho AB, Almeida FVS, Bronzato LS, Branquinha MH. Extracellular metalloproteinases in *Phytomonas serpens*. Can J Microbiol. 2003;**49**:221-4.

Vexenat AC, Santana JM, Teixeira ARL. 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. 1996;**28**:177-85.

Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. Int J Parasitol. 1994;**24**:1317-31.

Wallace FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. Exp Parasitol. 1966;**18**:124-93.

Wallis OC. Pentamidine resistance in the parasitic flagellate *Crithidia (Strigomonas) oncopelti*. J Protozool. 1966;**13**:230-4.