



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VIVIANE KROMINSKI GRAÇA DE SOUZA

**REATIVIDADE ANTIGÊNICA ENTRE *Phytomonas serpens* E
Trypanosoma cruzi: UMA ANÁLISE PROTEÔMICA**

Londrina
2006

VIVIANE KROMINSKI GRAÇA DE SOUZA

**REATIVIDADE ANTIGÊNICA ENTRE *Phytomonas serpens* E
Trypanosoma cruzi: UMA ANÁLISE PROTEÔMICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Co-orientador: Dr. Phileno Pinge Filho.

Londrina
2006

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S729r Souza, Viviane Krominski Graça de
Reatividade antigênica entre *Phytomonas serpens* e *Trypanosoma cruzi* : uma análise proteômica / Viviane Krominski Graça de Souza. – Londrina, 2006.
128f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.
Co-orientador: Phileno Pinge Filho.

Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2006.
Inclui bibliografia.

1. Microbiologia – Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* – Teses. 3. *Phytomonas serpens* – Teses. I. Ogatta, Sueli Fumie Yamada. II. Pinge Filho, Phileno. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 576.851.132

VIVIANE KROMINSKI GRAÇA DE SOUZA

**REATIVIDADE ANTIGÊNICA ENTRE *Phytomonas serpens* E
Trypanosoma cruzi: UMA ANÁLISE PROTEÔMICA**

BANCA EXAMINADORA

Profª Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta.
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Marco Antônio Nogueira
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger
Instituto de Biologia Molecular do Paraná/ Instituto
Oswaldo Cruz

Profª. Dra. Lucy Megumi Y. Lioni
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Londrina, 11 de setembro de 2006.

Aos meus pais **Ivo Matos Graça** e **Helena Krominski Graça**, pelos ensinamentos de vida, lições de caráter, honestidade e humildade, que me fizeram ser quem sou hoje. Vocês são o alicerce na minha vida!

Às minhas irmãs **Joice, Josy** e **Simone Krominski Graça**, por todo apoio e amor que me dedicam. Minha família é o meu bem maior.

Ao **Tércio O. de Souza**, por estar ao meu lado, por seu amor e dedicação. Obrigada por você existir.

À minha afilhada **Gabriela Graça Albuquerque**, simplesmente, porque você é um presente de Deus na minha vida.

Vocês são o que tenho de mais precioso na vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**, que guia e ilumina meus caminhos, toda minha força vem Dele.

À minha orientadora, **Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta**. Sempre agradeço a Deus por colocar na minha vida pessoas especiais, que jamais deixarão de ser importantes para mim; a Sueli é uma delas. Por uma eventualidade começamos a trabalhar juntas e a partir daí a minha admiração por sua competência, dedicação e sabedoria se consolidaram com suas ações. Obrigada pelos ensinamentos e oportunidades que você me proporcionou, em qualquer área, em todos os momentos. Sou eternamente grata.

Ao **Dr. Vítor Jankevicius**, por tudo que me ensinou; por ter me concedido a oportunidade de iniciar na pesquisa em seu laboratório e poder compartilhar toda sua sabedoria científica. Uma breve conversa com o Dr. Vítor era sempre uma aula que não se aprende nos livros. Ao meu eterno professor, todo meu respeito e admiração.

Ao **Dr. Phileno Pinge Filho**, pela co-orientação, por vários trabalhos que realizamos juntos, por seu entusiasmo e competência em fazer ciência. Obrigada por seus ensinamentos e por participar efetivamente da minha vida científica.

À **Dra. Shiduca Itow-Jankevicius**, por seus ensinamentos em fazer pesquisa com seriedade, dedicação e profissionalismo.

À **Tatiana Arruda Campos Brasil de Souza**, por sua amizade, companheirismo, dedicação, disponibilidade em colaborar sempre em tudo que precisei, e que esteve presente em vários momentos especiais da minha vida. Não existem palavras que possam traduzir toda minha gratidão e carinho que tenho por você. Minha amiga, muito obrigada!

Aos meus professores do curso de Pós Graduação em Microbiologia: **Dra Jacinta Sanchez Pelayo, Dra. Márcia Cristina Furlaneto, Dra. Rosa Elisa Carvalho Linhares, Dr. Sérgio Suzart dos Santos, Dr. Galdino Andrade Filho, Dra. Halha Ostrensky Saridakis, Dr. Carlos Mitihiko Nozawa e Dra. Eiko Nakagawa Itano**, por todo ensinamento.

Ao **Dr. Marco Antonio Nogueira**, pela correção desta Tese e por tudo que aprendi trabalhando ao seu lado na disciplina de Microbiologia.

Ao **Dr. Celso Vataru Nakamura** e a **Dra. Lucy Megumi Y. Lioni**, pela correção desta Tese e pelas oportunas sugestões.

À **Viviane Monteiro Góes**, por toda ajuda, dedicação e colaboração na realização deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório: **Fernando César Bizerra, Érika Izumi, Rita de Cássia Pontello Rampazzo, Vanessa Di Raimo, Natalia Botelho de Souza, Sérgio Luiz Prolo, Angélica Martins Batista, Janaina Ferro, Graziela Navarro, Lorena Bavia, Mariana Serpeloni e Suelen Balero de Paula**, por toda demonstração de carinho, amizade, companheirismo e por todos os momentos agradáveis que passamos juntos.

Ao meu amigo **Ediel Clementino da Costa**, por sua dedicação, por toda ajuda na realização deste trabalho, por todas as risadas que compartilhamos e simplesmente por ser um verdadeiro amigo; meu eterno agradecimento, obrigada por tudo!

À minha turma de doutorado: **Márcia Kiyoe Shimada, Claudia Ross e Renata Katsuko Takayama Kobayashi**, por todo carinho e amizade nesses quatro anos que convivemos. Jamais esquecerei de vocês. Meu agradecimento especial à minha amiga Renata Katsuko, por toda dedicação nas horas que mais precisei; uma verdadeira demonstração de amizade incondicional, a qualquer momento.

Ao **Dr. Marco Aurélio Krieger**, pela correção desta tese, por toda colaboração na realização deste trabalho, opiniões precisas, por toda sabedoria transmitida em uma simples conversa e por ter me recebido tantas vezes em seu laboratório com toda dedicação.

Ao **Dr. Samuel Goldenberg e Dr. Stênio Perdigão Fragoso**, pela oportunidade de realizar vários trabalhos em seus laboratórios.

Às amigas **Vera L. H. Tatakihara e Aparecida D. Malvezi**, que sempre estiveram presentes, ajudando nos momentos que mais precisei e em muitos experimentos.

Ao amigo **Paulo Roberto Ceridório Corrêa**, por sua disponibilidade em ajudar em todos os momentos e por sua valiosa dedicação na elaboração das figuras do trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia **João Alexandre Lopes (o Alex) e Rosilda Alvarenga**, por sempre colaborarem nos momentos necessários. A querida **Nalva Moreira dos Santos**, por sua paciência e amizade.

À minha sobrinha, **Ana Clara Krominski de Matos Pinheiro**, por seu carinho e alegria ao meu lado.

Ao **Charles Wellington de Matos Pinheiro**, por sua disponibilidade em colaborar.

Ao **Pedro Tarcizo Siqueira Souza e Marileide O. de Souza**, por todo apoio.

À família **Quadros: Marcos, Tarleide, João Vítor e Marcos Vinícius**, pelos momentos agradáveis que passamos em família, pela amizade, por tudo sempre.

Ao querido **Tarley O. de Souza**, por toda dedicação e carinho que sempre demonstrou por mim. Obrigada por sua preciosa ajuda e disponibilidade em Curitiba; jamais vou esquecer!

À **Carize Goulart**, por me receber sempre com muito carinho em minhas idas a trabalho a Curitiba.

Aos meus amigos que trabalham na cozinha, em especial a dona **Josefa Matias Carneiro e Adernaldo dos Santos**, por toda dedicação e carinho que demonstraram em todos esses anos.

À **Universidade Estadual de Londrina e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelos auxílios concedidos na realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Não sei...

**Não sei... se a vida é curta ou longa demais para nós,
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido
Se não tocamos os corações das pessoas.**

Muitas vezes basta ser:

**Colo que acolhe,
Braço que envolve,
Palavra que conforta,
Silêncio que respeita,
Alegria que contagia,
Lágrima que corre,
Olhar que acaricia,
Desejo que sacia,
Amor que promove.**

**E isso não é coisa do outro mundo,
É o que dá sentido à vida.**

**É o que faz com que ela não seja nem curta,
Nem longa demais, mas que seja intensa,
Verdadeira, pura... enquanto durar...**

Cora Coralina

Graça-de Souza, Viviane Krominski. **Reatividade antigênica entre *Phytomonas serpens* e *Trypanosoma cruzi*: uma análise proteômica.** 2006. 130f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RESUMO

O gênero *Phytomonas* abrange tripanossomatídeos parasitas de uma ampla variedade de plantas, os quais são responsáveis por fitopatologias importantes que tem como conseqüências grandes perdas econômicas. *Phytomonas serpens*, um tripanossomatídeo parasita de tomate, é transmitido entre plantas hospedeiras por insetos fitófagos. Prévios estudos em nosso laboratório mostraram que *P. serpens* apresenta reatividade antigênica com *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Soro de pacientes com doença de Chagas reagiram com extrato total de proteínas de *P. serpens* em ensaios de *Western blotting*. Em adição, a imunização oral com formas promastigotas vivas de *P. serpens* induziu uma redução significativa na parasitemia e mortalidade em camundongos desafiados com um alto número de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Nesse trabalho foi realizado uma análise proteômica de *P. serpens* 15T, mostrando que as proteínas reagiram com soro de pacientes chagásicos. Após eletroforese bidimensional de extrato protéico de *P. serpens*, 31 peptídeos foram selecionados e analisados por espectrometria de massa (MS/MS). Vinte e oito peptídeos foram identificados que corresponderam a 22 proteínas diferentes. A maioria desses polipeptídeos estão envolvidos no metabolismo do parasita. Também foi mostrado que células isoladas de linfonodos de camundongos BALB/c previamente imunizados com *P. serpens* apresentam significativos índices de estimulação na presença de antígenos totais de *T. cruzi*. A atividade do extrato etanólico de *Erythrina speciosa* (Et-Es) sobre *T. cruzi* e *P. serpens* também foi avaliada nesse estudo. A atividade antiproliferativa de Et-Es contra formas epimastigotas de cultura de *T. cruzi* foi observada nas concentrações de 250, 500 e 1000 ug/mL, onde houve 50, 60 e 75% de inibição de crescimento, respectivamente. Entretanto, a administração de Et-Es (50mg/kg de peso corporal) em camundongos Swiss infectados com 5×10^3 tripomastigotas de *T. cruzi*, provocou um significativo aumento na parasitemia, quando comparados com o grupo controle (infectados e não- tratados). Em *P. serpens* foi possível observar uma atividade antiproliferativa dose dependente de Et-Es sobre formas promastigotas. Na concentração de 1000 ug/mL houve 100% de inibição de crescimento.

Palavras-chave: Proteômica. *Phytomonas serpens*. *Trypanosoma cruzi*. Reatividade antigênica.

Graça-de Souza, Viviane Krominski. **Antigenic reactivity between *Phytomonas serpens* and *Trypanosoma cruzi*: a proteomic analysis.** 2006. 130f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

ABSTRACT

The genus *Phytomonas* comprises trypanosomatids that can parasitize a broad range of plant species and are responsible for important phytopathologies resulting in great economic losses. *Phytomonas serpens*, a trypanosomatid that parasitizes tomato, is transmitted among plants by phytofagous insects. Previous studies in our laboratory showed that *P. serpens* presents an antigenic reactivity with *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease. Sera of patients with Chagas' disease reacted with total protein extract from *P. serpens*, in *Western blotting* assays. In addition, oral immunization with live promastigotes of *P. serpens* reduced significantly the parasitemia and mortality in mice challenged with a high number of tripomastigotes of *T. cruzi*. In this work was realized a proteomic analysis of *P. serpens* 15T, showing what proteins reacted with sera of Chagasic patients. After 2D-electrophoresis of whole-cell lysates of *P. serpens*, 31 peptides were selected and analyzed by tandem mass spectrometry (MS/MS). Twenty eight peptides were identified resulting in 22 different putative proteins. The majority of this polypeptides are involved in parasite metabolism. It was also showed that lymph node cells isolated of BALB/c mice previously immunized with *P. serpens* present significant stimulation indices in the presence of total antigens of *T. cruzi*. The activity of ethanolic extract of *Erythrina speciosa* (Et-Es) over *T. cruzi* and *P. serpens* was also analysed in this study. The anti-proliferative activity of Et-Es against epimastigote forms of *T. cruzi* culture was observed in the concentrations of 250, 500 e 1000 µg/mL, where it was observed a growth inhibition of 50, 60 e 75% respectively. However, the administration of Et-Es (50mg/kg body weight) in Swiss mice infected with 5×10^3 tripomastigotes of *T. cruzi*, resulted in a significant increase in parasitemia when compared to control group (infected and non- treated). In *P. serpens*, it was possible to observe an anti-proliferative activity dose-dependent of Et-Es over promastigotes. In concentration of 1000 µg/mL it was observed a growth inhibition of 100%.

Keywords: Proteomic. *Phytomonas serpens*. *Trypanosoma cruzi*. antigenic reactivity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	adenina
C	citossina
DNA	ácido desoxirribonucléico
FCaBP	proteína flagelar ligante de cálcio
G	guanina
GYPMI	“Glucose, Yeast extract, Peptone, Meat Infusion”: glicose, extrato de levedura, peptona, infusão de carne
kb	1000 nucleotídeos em RNA ou 1000 pares de nucleotídeos em DNA
kDNA	DNA do cinetoplasto
KDa	quilo - Dalton
KFZ	Zona cinetoflagelar
kg	quilograma
RNA	ácido ribonucléico
LIT	“Liver Infusion Tryptose”: infuso de fígado e triptose
m7G	7- metil guanossina
mg	miligrama
Mb	1000 kb
NO	“Nitric Oxide”: óxido nítrico
OH	hidroxila
ORF	“open reading frame”: fase aberta de leitura
pb	pares de nucleotídeos em DNA
PBS	“Phosphate Buffer Saline”: solução tampão fosfato
PCR	“Polymerase Chain Reaction”: reação em cadeia da polimerase
PM	peso molecular

gRNA	RNA guia
mRNA	RNA mensageiro
rRNA	RNA ribossomal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SL-RNA	RNA da seqüência “spliced leader”
snRNP	“small nuclear ribonucleoprotein”: pequenas ribonucleoproteínas nucleares
snRNA	“small nuclear RNA”: pequeno RNA nuclear
SOD	superóxido dismutase
SSU	“small subunit”
T	timina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 A FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE	13
1.2 BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS: UMA VISÃO GERAL	16
1.2.1 Genoma dos tripanossomatídeos	17
1.2.2 Edição do RNA mitocondrial	21
1.2.3 Transcrição policistrônica e processamento do RNA	23
1.3 O GÊNERO <i>Phytomonas</i>	26
1.3.1 Características gerais das espécies definidas de <i>Phytomonas</i>	33
1.3.1.1 <i>Phytomonas françai</i>	33
1.3.1.2 <i>Phytomonas staheli</i>	34
1.3.1.3 <i>Phytomonas leptosporum</i>	34
1.3.1.4 <i>Phytomonas mcgheeii</i>	35
1.3.1.5 <i>Phytomonas serpens</i>	35
1.4 <i>Trypanosoma cruzi</i> E A DOENÇA DE CHAGAS	37
1.4.1 Resposta imunológica na infecção experimental por <i>T. cruzi</i> : uma visão geral	39
1.4.2 Tratamento na doença de Chagas	40
1.4.2.1 Mecanismo de ação do nifurtimox e benzonidazol	42
1.4.3 Perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas: exemplos de alvos potenciais no parasita	45
1.4.3.1 “Old yellow enzyme from <i>T. cruzi</i> ” (TcOYE)	45
1.4.3.2 Tripanotiona redutase	45
1.4.3.3 Metabolismo de purinas	46
1.4.3.4 Via de biossíntese do ergosterol	46
1.4.3.5 Cinetoplasto e edição do RNA	46
1.4.3.6 Outras enzimas	47
1.4.3.7 Considerações finais	47
1.5 REATIVIDADE IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE TRIPANOSSOMATÍDEOS	47
1.6 PROTEÔMICA	51
1.6.1 Espectrômetros de massa	52
1.6.1.1 Ionização da amostra	53
1.6.1.2 Analisadores de massa	55
1.6.1.2.1 Quadrupolo	56

1.6.1.2.2 Tempo de voo (TOF).....	57
1.6.2 Proteômica de tripanossomatídeos	57
2 OBJETIVOS	59
2.1 OBJETIVO GERAL	59
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICES	83
Apêndice A – Ensaio de linfoproliferação de camundongos BALB/c previamente imunizados com <i>P. serpens</i> 15T induzido por antígenos de <i>P. serpens</i> e <i>T. cruzi</i>	84
Apêndice B – Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> do extrato etanólico de <i>Erythrina speciosa</i> (Andrews) em formas promastigotas de <i>P. serpens</i>	86
Apêndice C – Artigo científico: <i>In vitro</i> trypanocidal activity of <i>Erythrina speciosa</i> (Andrews) is not related with control of infection in Swiss mice	88
Apêndice D – Artigo científico: Sera from patients with Chagas’ disease react with antigens of the tomato parasite <i>Phytomonas serpens</i> : a proteomic view	106
CONCLUSÕES GERAIS	130

1 INTRODUÇÃO

1.1 A FAMÍLIA Trypanosomatidae

A Família Trypanosomatidae pertence ao Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Sub-filo Mastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Kinetoplastida e Subordem Trypanosomatina. Compreende um grande número de protozoários flagelados separados em 9 gêneros: *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Rhynchoidomonas*, *Endotrypanum*, *Leishmania*, *Phytomonas* e *Trypanosoma*. Estes gêneros compartilham características peculiares, porém, nem sempre exclusivas da família Trypanosomatidae, tais como: presença de um único flagelo que se origina de uma abertura conhecida como bolsa flagelar; presença de uma rede de DNA organizada em uma mitocôndria única, conhecida como cinetoplasto; as primeiras reações da via glicolítica ocorrem em organelas conhecidas como glicossomas; edição de RNA mensageiro (mRNA); transcrição policistrônica; e a presença de microtúbulos subpeliculares [CLAYTON; MICHELS, 1996; GULL, 2001(Figura 1)].

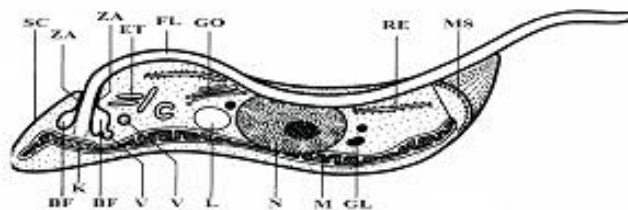


Figura 1 – Representação esquemática das estruturas intracelulares da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, um membro da Família Trypanosomatidae. **ZA**, zona de adesão na entrada do flagelo na bolsa flagelar; **V**, vesículas; **RE**, retículo endoplasmático; **FL**, flagelo; **BF**, bolsa flagelar; **GL**, glicossoma; **GO**, complexo de Golgi; **K**, cinetoplasto; **L**, lisossoma, **M**, mitocôndria; **MS**, microtúbulos subpeliculares; **N**, núcleo; **SC**, superfície celular; **ET**, estrutura tubovesicular.

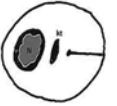


Fonte: Landfear e Ignatushchenko (2001).






A maioria dos tripanossomatídeos apresenta um complexo ciclo de vida, exibindo uma variedade de estágios que refletem transformações devido às mudanças

estruturais e fisiológicas (SOUTO-PADRÓN, 2002). Esses microrganismos podem ser divididos em dois grupos distintos: os monoxênicos, que desenvolvem seu ciclo de vida em um hospedeiro invertebrado, e os heteroxênicos, que alternam seu ciclo de vida entre dois hospedeiros, um invertebrado e um segundo, que pode ser um vertebrado ou um vegetal. Os estágios morfológicos (Tabela 1) são definidos de acordo com a forma geral da célula e a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, e são características auxiliares importantes para a identificação de vários gêneros (McGHEE; COSGROVE, 1980).

O estudo preferencial de alguns tripanossomatídeos heteroxênicos se justifica pelo fato de serem agentes etiológicos de doenças importantes em humanos, animais domésticos e plantas (PACHECO et al., 1998; DE SOUZA; MOTTA, 1999; PODLIPAEV, 2001). Dos diversos gêneros reconhecidos, pelo menos dois incluem espécies patogênicas para humanos e animais (*Leishmania* - leishmanioses e *Trypanosoma* - tripanossomíases) e um para plantas (*Phytomonas*). Além disso, os tripanossomatídeos são utilizados como modelos para o estudo de vários processos biológicos importantes, tais como diferenciação celular, expressão gênica e sua regulação, interação parasita-hospedeiro, entre outros.

Tabela 1- Estágios morfológicos da família Trypanosomatidae.

Forma evolutiva	Definição	Gênero	Morfologia
Amastigota	Forma arredondada ou oval, com o flagelo curto contido na bolsa flagelar . O flagelo não se exterioriza, o que erroneamente fez com que estas formas recebessem a denominação de amastigotas, referindo-se a ausência de flagelo.	<i>Leishmania</i> <i>Trypanosoma</i> <i>Endotrypanum</i>	
Promastigota	Forma alongada com cinetoplasto localizado na região anterior ao núcleo; o flagelo fica livre na extremidade anterior da célula.	<i>Leptomonas</i> <i>Herpetomonas</i> <i>Leishmania</i> <i>Endotrypanum</i> <i>Phytomonas</i>	
Opistomastigota	Forma alongada com cinetoplasto localizado posteriormente ao núcleo; o flagelo percorre todo o citoplasma e emerge na extremidade anterior.	<i>Herpetomonas</i>	

Coanomastigota	Célula em forma de pêra, com cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo livre.	<i>Crithidia</i>	
Tripomastigota	Forma alongada com cinetoplasto posterior ao núcleo. O flagelo se exterioriza ainda na região posterior e percorre externamente toda superfície do protozoário. O flagelo apresenta-se aderido ao corpo celular dando o aspecto da existência de uma membrana ondulante.	<i>Rhynchoidomonas</i> , <i>Trypanosoma</i> <i>Endotrypanum</i>	
Epimastigota	Forma alongada com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo. O flagelo nesta forma se exterioriza e percorre a superfície anterior do protozoário dando o aspecto da formação de uma membrana ondulante curta.	<i>Blastocrithidia</i> <i>Trypanosoma</i> <i>Endotrypanum</i>	
Esferomastigota	Forma arredondada com cinetoplasto anterior ao núcleo e o flagelo circundando parcialmente a superfície do protozoário.	<i>Trypanosoma cruzi</i> (no inseto)	
Paramastigota	Forma alongada com cinetoplasto margeando o núcleo lateralmente.	<i>Herpetomonas</i> (Janovy et al., 1974) <i>Crithidia deanei</i> (Souza & Corte Real, 1991). <i>Leishmania</i>	

Uma característica peculiar da família Trypanosomatidae é que seus membros utilizam diferentes vias metabólicas para a interconversão dos aminoácidos ornitina-citrulina-arginina. As enzimas envolvidas nesta via (listadas abaixo) exibem um padrão relacionado aos diferentes gêneros, mostrando um valor taxonômico confiável [YOSHIDA et al., 1978; CAMARGO et al., 1987; ITOW-JANKEVÍCIUS et al., 1993; CAMARGO, 1999; BATISTOTI et al., 2001 (figura 2)]:

► **Arginase:** Esta enzima converte arginina em ornitina, CO₂ e uréia. A atividade arginase é observada nos gêneros *Crithidia* e *Leishmania*, e também em algumas espécies de *Leptomonas*.

► **Arginina-deiminase:** A atividade arginina deiminase ocorre no gênero *Herpetomonas*, e algumas espécies de *Leptomonas* e *Phytomonas*, convertendo arginina em citrulina e amônia;

► **Citrulina hidrolase:** Esta enzima ocorre nos gêneros *Phytomonas*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* e *Crithidia*, cuja atividade converte citrulina em ornitina, CO₂ e amônia;

► **Ornitina carbamoiltransferase:** Esta atividade enzimática, embora tenha sido definida como característica do gênero *Herpetomonas*, já foi detectada também em *Phytomonas*. É caracterizada pela síntese de citrulina a partir de ornitina e carbamoil fosfato;

► **Argininosuccinato sintetase:** Promove a síntese de argininosuccinato a partir de citrulina e aspartato.

► **Argininosuccinato liase:** Promove a síntese de arginina e fumarato pela conversão de argininosuccinato.



Figura 2 – Ciclo da ornitina- arginina em tripanossomatídeos.

Fonte: De Souza e Motta (1999), modificado.

1.2 BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS: UMA VISÃO GERAL

Como mencionado anteriormente, os tripanossomatídeos podem “habitar” diferentes tipos de organismos, apresentando uma grande diversidade ecológica e biológica. Em geral, as interações do parasita com seus diferentes hospedeiros são acompanhadas por transformações morfológicas, ultraestruturais e fisiológicas em resposta aos estímulos encontrados nesses ambientes. Essas alterações são decorrentes de mecanismos controlados de expressão gênica.

1.2.1 Genoma dos tripanossomatídeos

Como ocorre em outros eucariotos, os tripanossomatídeos apresentam dois genomas distintos: um localizado no núcleo e o outro na mitocôndria. Os genomas das espécies patogênicas para mamíferos, *T. brucei* (BERRIMAN et al., 2005), *T. cruzi* (EL-SAYED et al., 2005b) e *L. major* (IVENS et al., 2005) apresentam um core conservado de cerca de 6200 genes. Sequências gênicas espécie-específicas, principalmente famílias de antígenos de superfície, também foram observadas nesses genomas [EL-SAYED et al., 2005a (Tabela 2)].

Os cromossomas dos tripanossomatídeos são difíceis de serem visualizados, por não sofrerem condensação em nenhum estágio do ciclo celular. Entretanto, através das técnicas de eletroforese em campo de pulso alternado, tem sido possível avaliar o número de bandas cromossômicas presentes nesses parasitas (HENRIKSSON et al., 1996). O número de bandas cromossômicas pode variar significativamente entre as diferentes cepas e clones, inclusive entre clones derivados de uma mesma cepa, como ocorre em *T. cruzi* (DVORAK et al., 1982; AYMERICH; GOLDENBERG, 1989; HENRIKSSON et al., 1996). Além disso, variação no tamanho entre os cromossomos homólogos também foi observado (HENRIKSSON et al., 1996; EL-SAYED et al., 2005a).

Os genes estão organizados em grandes unidades transcricionais e um grande número está representado como cópias múltiplas. Maiores detalhes sobre esse tema serão abordados no item Transcrição policistrônica e processamento do RNA.

Tabela 2 – Características gerais dos genomas de espécies de tripanossomatídeos patogênicos para o homem.

Características	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. major</i>
Tamanho do genoma haplóide (Mb)	25*	55	33
Número de cromossomas por genoma haplóide	11*	~28 ^a	36
Número de genes por genoma haplóide	9068 ^b	~12000 ^c	8311 ^d

* Exceto ~100 mini e intermediários cromossomas (total de 10 Mbp). **a:** O número exato é desconhecido e cromossomas homólogos podem diferir em relação ao tamanho; **b:** Incluindo 904 pseudogenes; **c:** O número exato não foi determinado; **d:** Incluindo 34 pseudogenes.

Fonte: El-Sayed *et al.* (2005a), modificado.

Diferente de outros eucariotos, o DNA mitocondrial de tripanossomatídeos, também chamado de DNA do cinetoplasto (kDNA) é constituído por duas classes distintas de moléculas circulares e covalentemente fechadas, os minicírculos e os maxicírculos (SCHNEIDER, 2001; MORRIS et al., 2001; LUKES et al., 2005). Essas moléculas diferem em tamanho e função, e formam uma rede de moléculas conectadas, que se replicam por um mecanismo incomum (RYAN et al., 1988; GUILBRIDE; ENGLUND, 1998). Os minicírculos são liberados dessa rede por uma topoisomerase para uma região conhecida como zona cinetoflagelar (KFZ) (DREW; ENGLUND, 2001) para serem replicados livres em um modelo teta (θ). O kDNA apresenta-se firmemente ligado ao corpúsculo basal flagelar (SIMPSON, 1986) e este se encontra no citoplasma associado com o citoesqueleto (ROBINSON; GULL, 1991). As regiões repetitivas presentes nas regiões não codificantes dessas moléculas são ricas em A-T. Dessa forma, o kDNA apresenta menor conteúdo GC quando comparado com DNAs mitocondriais de outros organismos eucariotos, exceto dos insetos (SHIOIRI; TAKAHATA, 2001).

O perfil eletroforético do DNA do minicírculo após digestão com enzimas de restrição mostrou que o mesmo é altamente heterogêneo em sua seqüência, permitindo a distinção entre diferentes isolados, cepas e clones dentro da mesma espécie. Cada minicírculo é organizado em quatro regiões conservadas repetidas de 120 pb e quatro regiões variáveis não repetitivas (STURM et al., 1989). Nas regiões conservadas é encontrada a origem de replicação (RAY, 1989; KLINGBEIL et al., 2001). Quanto ao tamanho, são geralmente homogêneos, variando de 0,5 a 2,5 kb, estão presentes entre 10.000 a 20.000 cópias na célula e não codificam para proteínas funcionais (GUILBRIDE; ENGLUND, 1998; KLINGBEIL et al., 2001). Shlomai e Zadok (1984) descreveram a presença de uma fase aberta de leitura (ORF) em *Crithidia fasciculata* com um provável sítio para início da tradução, porém, a natureza funcional, bem como o papel dessa proteína no seu ciclo biológico ainda não foram determinados. Os minicírculos codificam pequenos RNA guias (gRNA) que controlam a especificidade do processo de edição do RNA.

Os maxicírculos, por sua vez, apresentam-se em menor número; entre 20 a 50 cópias por célula, com tamanhos variando em torno de 20 a 40 kb. Os genes dos maxicírculos codificam para RNAs ribossomais (rRNA) e enzimas envolvidas no processo de respiração celular (Guilbride & Englund, 1998), correspondendo funcionalmente ao DNA mitocondrial de outras células eucarióticas. Nos maxicírculos dos tripanossomatídeos patogênicos para mamíferos foram detectados dezoito genes que codificam proteínas e dois que codificam RNA

ribossomais [BERRIMAN et al., 2005; EL-SAYED et al., 2005b; IVENS et al., 2005; WESTENBERGER et al., 2006 (Figura 3)].

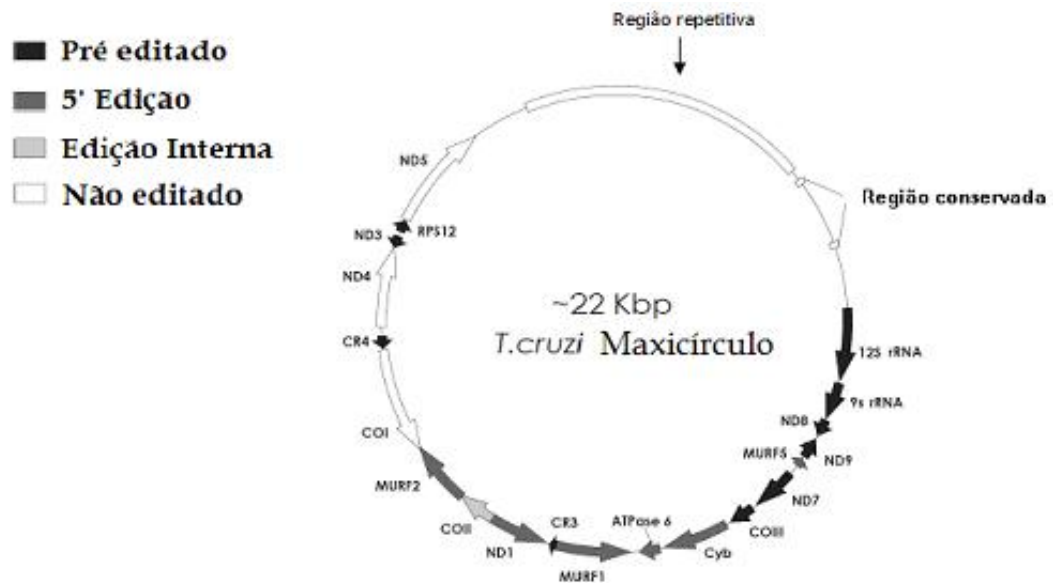


Figura 3 – Representação esquemática de um maxicírculo de *T. cruzi*. As setas indicam a orientação da transcrição. ND: NADH desidrogenase (subunidades), MURF: *mitochondrial unidentified reading frame*, RPS: *ribosome-binding protein*, CR4: *C-rich region*, COI: citocromo oxidase I, COII: citocromo oxidase II, COIII: citocromo oxidase III.

Fonte: Westenberger *et al.* (2006).

Os minicírculos replicam-se unidirecionalmente e individualmente em um modelo teta (θ), mas somente após serem liberados da rede do kDNA [Figura 4 (DREW; ENGLUND, 2001)]. Uma característica interessante é que apresentam um ou vários ‘gaps’ como resultado de um padrão descontínuo de replicação. Os minicírculos recém sintetizados se localizam na periferia da rede (Figura 5).

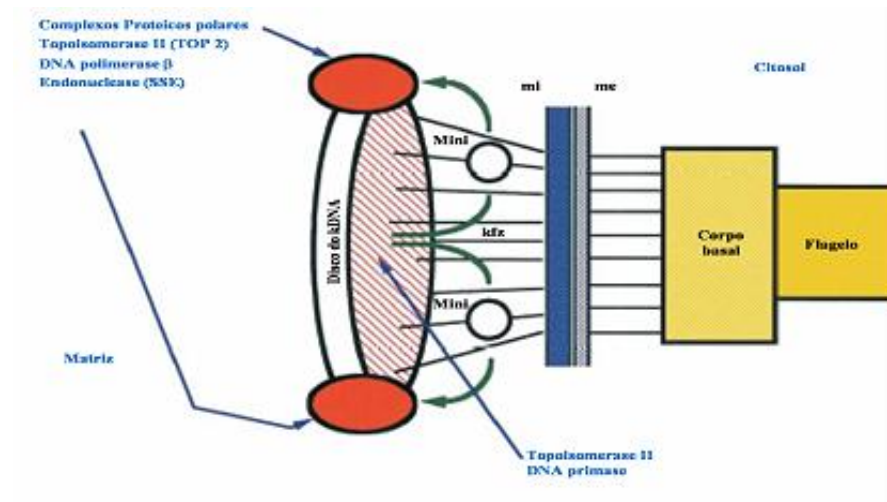


Figura 4 – Processo de replicação do kDNA. Os minicírculos (**mini**) são liberados individualmente para serem replicados entre o disco do kDNA e a membrana interna da mitocôndria (**mi**), conhecida como zona cinetoflagelar (**kfz**) (Drew & Englund, 2001). Depois são direcionados para os complexos protéicos (**cp**, em vermelho) nos pólos da rede. As enzimas que participam da replicação e formação do kDNA são listadas e direcionadas quanto à localização (em azul). O flagelo encontra-se ligado ao corpo basal que está firmemente ligado ao citoplasma e à membrana externa da mitocôndria (**me**), formando um triplet com o cinetoplasto, desempenhando função essencial na segregação do kDNA recém sintetizado

Fonte: Schneider (2001).

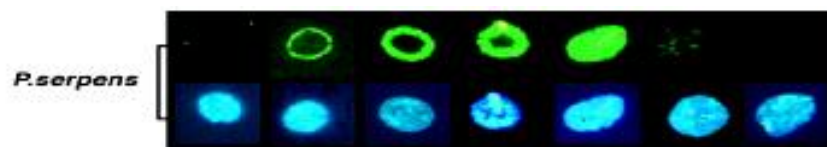


Figura 5 – Rede de kDNA de *Phytomonas serpens* em progressivo estágio de replicação. A fileira de imagens em A representa o kDNA de *P. serpens* marcado com dUTP-F (5(6)-fluoresceína-carboxamidocaproil-[5-(3-aminoalil)-2'-deoxi-uridina-5'-trifosfato] usando DNA polimerase 1, que intercala-se com os minicírculos com 'gaps', revelando o padrão proposto de distribuição dos minicírculos na periferia. A coluna 1 representa o estágio que antecede a replicação sem nenhuma fluorescência; 2 representa o estágio inicial de replicação com uma fina camada de fluorescência devido a poucos 'gaps' existentes, aumentando gradativamente a fluorescência de acordo com o aumento dos minicírculos replicados (Colunas de 3 a 5), em 6 e 7, representa os minicírculos que sofreram reparo dos gaps, com conseqüente perda da fluorescência. A fileira de imagens na parte inferior mostra o mesmo kDNA corado com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol), que cora uniformemente toda a rede, independente dos 'gaps' e do estágio de replicação. As redes estão arranjadas da esquerda para a direita de acordo com o estágio de replicação.

Fonte: Guilbride e Englund (1998), modificado.

1.2.2 Edição do RNA mitocondrial

A expressão das proteínas codificadas pelos genes mitocondriais requer processamento que, apesar de não ser exclusivo dos tripanossomatídeos, mostra significativa diferença com outros organismos. Os transcritos primários dos maxicírculos geralmente não codificam para ORFs completas, necessitando a conversão em mRNAs devidamente processados por um mecanismo conhecido como edição do RNA (LUKES et al., 2005). Esse processo é um evento pós-transcricional, que em tripanossomatídeos envolve a inserção e, com menor frequência, deleção de uridinas em uma determinada posição nos transcritos primários (STUART et al., 1997).

O processo de edição é monitorado por um complexo protéico, o editossomo e os gRNAs, que especificam os blocos a serem editados [STUART; PANIGRAHI, 2002; MADISON-ANTENUCCI et al., 2002; LUKES et al., 2005 (Figuras 6 e 7)]. A reação inicia-se entre o pré-mRNA (região a ser editada) e o gRNA [região do gRNA denominada âncora (Figura 7)]. Uma coordenada seqüência de reações enzimáticas é desencadeada, com o editossomo ligado ao mRNA e gRNA, iniciando o ciclo de edição. No início de cada ciclo enzimático há o reconhecimento do híbrido mRNA-gRNA por uma endonuclease e clivagem do mRNA especificamente no primeiro nucleotídeo não pareado. No próximo passo, resíduos de uridinas são inseridos por uma uridina terminal transferase (TUTase) ou removidos por uma uridina exonuclease (ExoUase), gerando assim, um transcrito funcionalmente maduro.

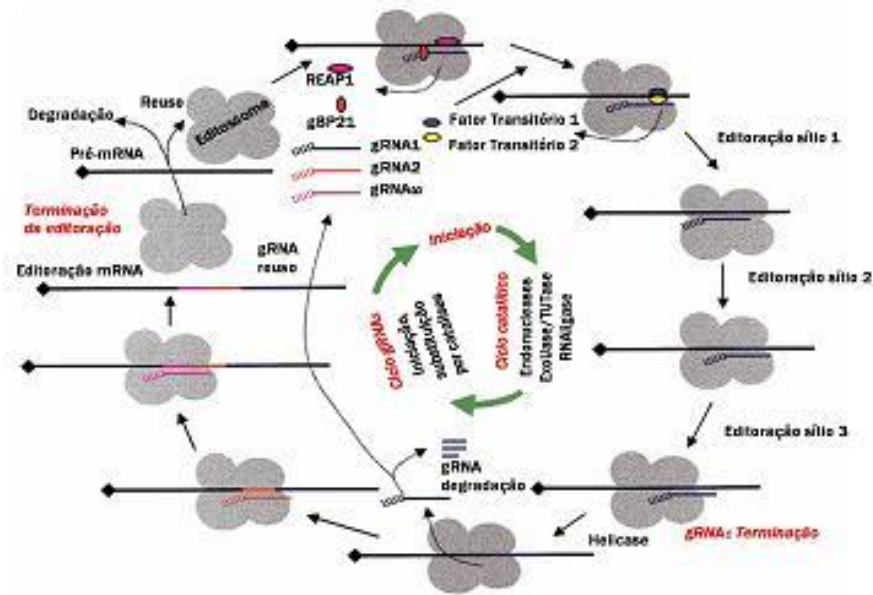


Figura 6 – O ciclo de edição do RNA. O processo tem início com a formação da âncora entre o mRNA e gRNA ligado ao editossomo. Proteínas como a REAP1/gBP21 e fatores transitórios 1 e 2 podem participar do processo de ligação e estabilização dos RNAs com o editossomo, respectivamente. Os gRNAs especificam os blocos a serem editados no mRNA, com ciclos de inserções e deleções de uridinas. Vários gRNAs podem participar do processo (gRNA1, gRNA2, gRNAw), talvez pela ação de uma helicase. O mRNA editado é liberado para a maquinaria de tradução após a terminação da decodificação do gRNA final (gRNAw). O editossomo e gRNAs podem ser reutilizados em novos processos ou são degradados.

Fonte: Stuart e Panigrahi (2002).

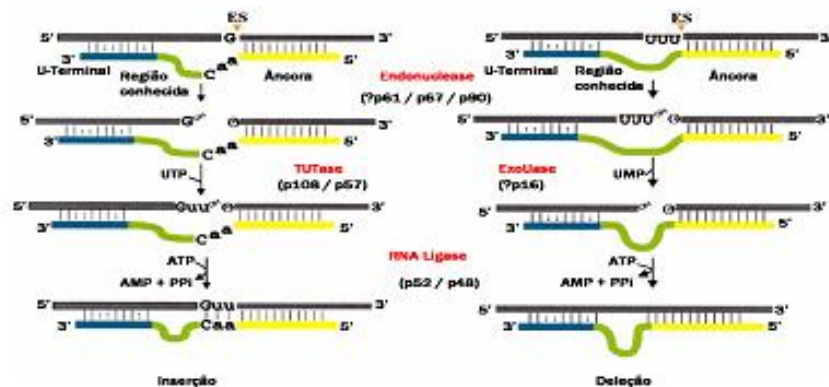


Figura 7 – Mecanismo de inserção ou deleção de resíduos de uridinas (Us) durante a edição do RNA. O pré-mRNA (barra superior) e o gRNA (barra inferior) formam a âncora de ligação: mRNA/gRNA. O gRNA contém a cauda poli U na extremidade 3', a região central com informação (região conhecida) do bloco a ser editado e a âncora. Uma endonuclese cliva o pré mRNA e Us são inseridas ou deletadas por TUTase ou ExoUase, respectivamente. Uma RNA ligase une o bloco editado à extremidade 3' do mRNA para completar o processo de edição.

Fonte: Stuart e Panigrahi (2002).

1.2.3 Transcrição policistrônica e processamento do RNA

Em tripanossomatídeos, os genes que codificam para proteínas não contêm íntrons, em sua maioria, e frequentemente são transcritos como RNA policistrônicos (JOHNSON et al., 1987), que após processamento, originam mRNA maduros monocistrônicos. Essas unidades transcricionais podem conter várias cópias em tandem do mesmo gene, ou genes cujas funções são relacionadas ou não, e separados por regiões intergênicas. Além disso, diferenças no padrão de expressão desses genes também podem ser detectadas (CULLY et al., 1985; PAYS; NOLAN, 1998).

Os mRNA monocistrônicos são gerados a partir de duas reações de clivagem dentro da região intergênica, uma associada ao *trans-splicing* e outra, a poliadenilação (LEBOWITZ et al., 1993; BERBEROF et al., 1995). *Trans-splicing* é uma reação intermolecular de processamento de RNA na qual éxons de duas moléculas distintas de RNA são unidos para formar um transcrito funcionalmente maduro (SUTTON; BOOTHROYD, 1986; ULLU et al., 1996). Este processo envolve uma molécula de RNA doadora (SL-RNA) de uma seqüência de aproximadamente 39 nucleotídeos extremamente conservada, denominada seqüência líder (SL: *spliced leader*) ou minixon e que será transferida para a extremidade 5' do mRNA [VANHAMME; PAYS, 1995; LIANG et al., 2003 (Figura 8)].

Similarmente como ocorre em outros eucariotos, no primeiro nucleotídeo da porção 5' do SL-RNA é adicionado um resíduo de guanina metilado na posição 7 (m7G), mas interessante, os quatro nucleotídeos adjacentes são também modificados com a inserção de grupos metil, constituindo a estrutura cap4 (m7GpppAmAmCmUm), como é designado.

Após a descoberta do mecanismo de *trans-splicing* em tripanossomatídeos, algumas questões sobre como os dois RNAs envolvidos no processo se reconheciam e se organizavam permaneciam sem respostas. Hoje, no entanto, já se sabe da participação de ribonucleoproteínas (snRNPs) associadas a pequenos RNAs nucleares [snRNAs: U1, U2, U4, U5, U6 (Figura 9)], similarmente como ocorre no mecanismo de *cis-splicing*. A última U snRNA descrita foi U1 em *C. fasciculata* (SCHNARE; GRAY, 1999).

A reação de poliadenilação nesses microrganismos está acoplada ao *trans-splicing* (LEBOWITZ et al., 1993; MATTHEWS et al., 1994). Evidências sugerem que a reação ocorre dentro de uma região curta localizada à montante (cerca de 100 a 400 nucleotídeos) do motivo de polipirimidinas (MATTHEWS et al., 1994). Em *T. brucei*, na maioria dos mRNA, a poliadenilação ocorre em uma posição contendo um ou mais resíduos de

adenina localizada entre 80 a 140 nucleotídeos do motivo de polipirimidina (BENZ et al., 2005).

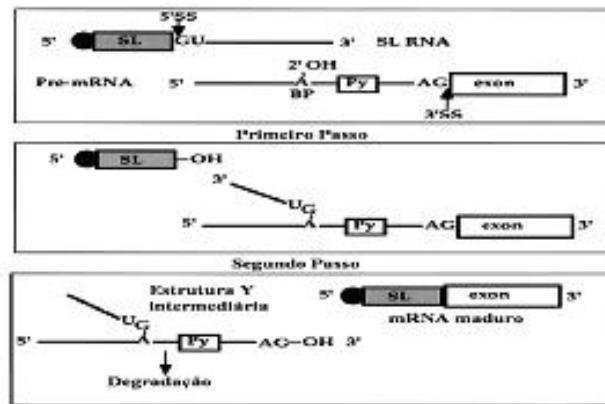


Figura 8 – Mecanismo de *trans-splicing* em tripanossomatídeos. O produto final é resultado de duas reações de transesterificação que ocorrem consecutivamente. Os sítios **GU** no SL RNA e **AG** no pré-RNA estão indicados. Inicialmente, SL RNA é clivado no sítio acceptor de *splicing* (**5'SS**) e a extremidade 5' do “intron” é ligada ao sítio de ramificação (**A**) localizado à montante do sítio acceptor de *splicing* na extremidade 3' (**3'SS**) do “intron” do pré-mRNA, formando um intermediário ramificado, a estrutura em Y. A seguir, os dois “exons” (**SL** e **exon**) são ligados e a cauda poli A é adicionada na extremidade 3' final do RNA, formando um mRNA maduro. A estrutura Y é degradada. Observe que a SL apresenta em sua extremidade 5' o cap4 (●). **Py**: motivo de polipirimidina.

Fonte: Liang *et al.* (2003), modificado.

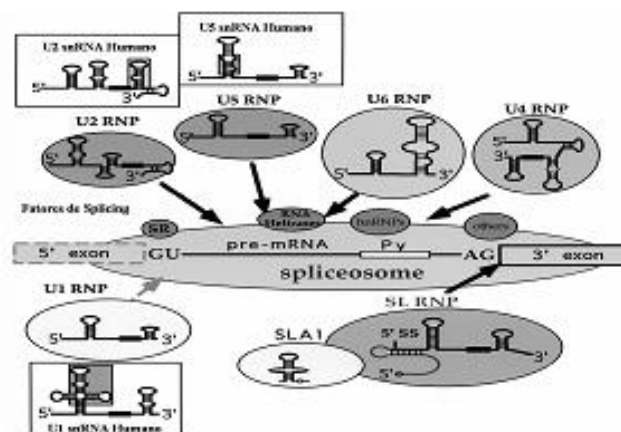


Figura 9 – Repertório das snRNAs e proteínas acessórias dos tripanossomatídeos envolvidas no mecanismo de *trans-splicing*. Os quadrados mostram os complexos homólogos em humanos.

Fonte: Liang *et al.* (2003), modificado.

As três polimerases clássicas de eucariotos, classificadas de acordo com a resposta à substância α -amanitina, já foram identificadas em tripanossomatídeos [HODO; HATCHER, 1986; PALENCHAR; BELLOFATTO, 2006 (Tabela 3)]. Entretanto, poucos promotores foram identificados até o momento. Gilinger e Bellofatto (2001) mostraram que a transcrição de genes de SL-RNA de *Leptomonas seymouri* é dependente de uma RNA polimerase II. Entretanto, outros resultados mostram que a RNA polimerase I e promotores ribossomais podem ser usados para transcrever genes que codificam proteínas em tripanossomatídeos (RUDENKO et al., 1991; ZOMERDIJK et al., 1991; OTSU et al., 1993; TYLER-CROSS et al., 1995; BIEBINGER; CLAYTON, 1996; MARTINEZ-CALVILLO et al., 1997; DOWNEY; DONELSON, 1999).

Tabela 3 – Classificação das RNAs polimerases de eucariotos de acordo com a resposta a α -amanitina e especificidade da transcrição (PALENCHAR; BELLOFATTO, 2006).

Enzima	Produto da transcrição		Resposta a α -amanitina
	Eucariotos	Tripanosomatídeos	
RNA polimerase I	rRNA (18S, 28S)	rRNA (5.8S,18S, 28S)	Resistente
		VSG-mRNA	
		PARP-mRNA	
RNA polimerase II	mRNA	mRNA	Sensível
	snRNA	SL-RNA	
RNA polimerase III	snRNA	snRNA	Moderadamente
	scRNA	tRNA	Resistente
	tRNA	rRNA (5S)	
	rRNA (5S)		

RNA: ácido ribonucléico; rRNA: RNA ribossomal; mRNA: RNA mensageiro; snRNA: pequenos RNAs nucleares (RNA *small nuclear*); scRNA: pequenos RNAs citoplasmáticos (*small cytoplasmic*); tRNA: RNA transportador; SL-RNA: *spliced leader* RNA; VSG: glicoproteína variante de superfície (*variant surface glycoprotein*); PARP: prociclinas (*procyclic acidid repetitive protein*); S: Svedberg.

1.3 O GÊNERO *PHYTOMONAS*

O gênero *Phytomonas* engloba parasitas heteroxênicos isolados de pelo menos 17 famílias de plantas e que são transmitidos a esses hospedeiros pela saliva de insetos fitófagos infectados (CAMARGO, 1999).

A primeira descrição de um protozoário em vegetais ocorreu em 1909 quando Alexandre Lafont descobriu que vasos lactíferos de membros pertencentes à Família *Euphorbiaceae*, abrigavam protozoários flagelados e alongados.

A descoberta de Lafont interessou aos protozoologistas, que intensificaram as pesquisas na época com o intuito de verificar a presença e isolar novos tripanossomatídeos em vegetais. Assim, ainda em 1909 Donovan também verificou a presença desses microrganismos em *Euphorbia pilulífera* e sugeriu a utilização de um novo gênero para descrever e diferenciar protozoários parasitas de vegetais, daqueles encontrados em insetos e vertebrados. Porém, a utilização do gênero *Phytomonas* entre os pesquisadores não foi unânime. Muitos continuavam a classificar os tripanossomatídeos dentro dos gêneros já existentes. Somente nos anos 70 e 80 que o gênero *Phytomonas* ganhou aceitação entre os pesquisadores como o gênero que reúne todos os flagelados de plantas (CAMARGO, 1999).

Em um período de aproximadamente 20 anos a partir da primeira descrição de tripanossomatídeos em plantas por Lafont, inúmeras publicações relataram a presença de protozoários flagelados em vegetais. No entanto, as descobertas nessa época referiam-se apenas a microrganismos encontrados no látex. Stahel (1931) descreveu pela primeira vez a presença de protozoários nos vasos condutores de seiva do café. Foi a primeira descrição de uma fitopatologia atribuída a tripanossomatídeos em plantas não lactíferas e ficou conhecida como necrose do floema do café. Outras fitopatologias bem definidas foram associadas à tripanossomatídeos somente 40 anos mais tarde, com o isolamento do microrganismo no floema de coqueiros e de dendezeiros, que foram associados a síndromes conhecidas como Hartrot (PARTHASARATHY et al., 1976) e Marchitez sorpressiva (DOLLET; LOPES, 1978) respectivamente. Em 1986, Kitajima e colaboradores descrevem uma nova fitopatologia na mandioca, conhecida como “chochamento das raízes” desencadeada por um protozoário encontrado no látex, *Phytomonas françai*. A partir da década de 80 ocorreram vários relatos de isolamento de tripanossomatídeos em frutos (Tabela 4), apesar de anteriormente alguns autores já terem relatado este fato.

Tabela 4 – Frutos infectados por tripanossomatídeos a partir da década de 80.

Hospedeiro	Espécie	Referência
Amora	<i>Morus spp</i>	Cavazzana <i>et al.</i> , 1993
Bergamota	<i>Citrus ergamia</i>	Conchon <i>et al.</i> , 1989
Caju	<i>Anacardium occidentale</i>	Conchon <i>et al.</i> , 1989
Carambola	<i>Averrhoa carambola</i>	Conchon <i>et al.</i> , 1989
Coqueiro	<i>Cocos nucifera</i>	Menara <i>et al.</i> , 1988
Laranja	<i>Citrus aurantium</i>	Carrara <i>et al.</i> , 1992
Laranja	<i>Citrus aurantium var. Lumia</i>	Fiorini <i>et al.</i> , 1990
Maçã	<i>Malus spp</i>	Cavazzana <i>et al.</i> , 1995
Pêssego	<i>Prunus pérsica</i>	Conchon <i>et al.</i> , 1989
Pitanga	<i>Eugenia spp</i>	Cavazzana <i>et al.</i> , 1996
Romã	<i>Punica granatum</i>	Catarino <i>et al.</i> , 1991
Tangerina	<i>Citrus reticulata</i>	Conchon <i>et al.</i> , 1989
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Jankevicius <i>et al.</i> , 1987
Tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jankevicius <i>et al.</i> , 1989
Tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Fiorini <i>et al.</i> , 1993
Urucum	<i>Bixa orellana</i>	Almeida <i>et al.</i> , 1990
Uva	<i>Vitis vinifera var Itália</i>	Carrara <i>et al.</i> , 1992

Desde 1909, com a proposta de Donovan para que tripanossomatídeos de plantas fossem colocados em um novo gênero, uma interminável divergência entre os pesquisadores da época iniciou-se e ainda continua. Hoje, quase 100 anos depois, as discussões referem-se aos atuais vetores de *Phytomonas* spp e ao hospedeiro de origem desses protozoários. A questão é se todos os flagelados recuperados de plantas e insetos fitófagos, somente por estas características, podem ser nomeados como *Phytomonas*.

Apesar da utilização de um único gênero, '*Phytomonas*', para agrupar todos tripanossomatídeos de plantas, é evidente a ocorrência de diferenças em termos de propriedades biológicas e efeitos que produzem na planta de acordo com o local do

parasitismo. Dollet (2001) defende incisivamente a heterogeneidade dos tripanossomatídeos isolados de plantas e que a utilização de um único gênero não é conveniente. Afirma ainda, que somente os isolados do floema, constituem um grupo homogêneo de tripanossomatídeos que exclusivamente podem ser alocados em um único gênero por suas propriedades biológicas relacionadas à: 1) composição nutricional do floema; 2) distribuição geográfica; 3) grupos sorológicos; 4) padrão de isoenzimas; 5) mini - círculos do cinetoplasto; 6) RNA ribossomal; 7) Miniexon.

Outra questão, no mínimo curiosa, foi à descoberta de que somente alguns isolados eram a causa de doenças em safras importantes como café, coco, mandioca e dendezeiros (NUNES et al., 1995; CAMARGO, 1999), e que muitas outras espécies de plantas parasitadas por estes protozoários não sofriam nenhum dano aparente. Por que esta diferença ocorria, uma vez que as plantas abrigavam o mesmo parasita? Constatou-se então, que a distribuição de *Phytomonas* spp na planta ocorre em distintos locais: dutos lactíferos, frutos, sementes e no floema, sendo que a maioria dos isolados do floema estão associados às fitopatologias bem definidas (CAMARGO, 1999; DOLLET, 2001).

Não é difícil observar que as condições nutricionais encontradas pelos tripanossomatídeos do floema, látex, frutos e sementes são essencialmente diferentes. O microambiente encontrado no látex, por exemplo, é considerado como uma defesa estratégica da planta por ser tóxico, enquanto no floema, a seiva é rica em complexos nutrientes, desde numerosos açúcares a diversos outros constituintes essenciais para o crescimento. Dessa forma, o cultivo *in vitro* de parasitas do floema não é tarefa fácil devido às especificidades de componentes físicos e bioquímicos característicos desse ambiente, o que corrobora a singularidade deste grupo. Nesse sentido, esses tripanossomatídeos têm sido isolados somente em cultura de células de inseto (MÉNARA et al., 1988). O cultivo axênico é possível após inúmeras transferências para meios com concentrações gradativamente diminuídas de células de insetos (DOLLET, 2001).

Para o isolamento e cultivo de parasitas encontrados no látex, frutos e parasitas de insetos fitófagos, são utilizados meios bifásicos (CAMARGO, 1999). Após o isolamento e algumas passagens nesse meio, os tripanossomatídeos podem ser mantidos em diversos meios líquidos de escolha como, LIT - *liver infusion tryptose* (CAMARGO, 1964); FYTS - *folic acid, yeast extract, trypticase, sucrose* (ROITMAN et al., 1972); RDM - *Roitman's defined medium*- (ROITMAN et al., 1972); GYPMI - *glucose, yeast extract, peptone, meet infusion* (ITOW-JANKEVÍCIUS et al., 1993) e outros.

Em vista disso, os tripanossomatídeos de plantas têm sido separados em quatro grupos distintos, baseado na localização nos tecidos do hospedeiro (CAMARGO, 1999): **lactícolas** - que refere-se a flagelados que vivem no látex de várias famílias de plantas; **floemícolas** - este grupo compreende tripanossomatídeos que vivem no floema e estão associados às síndromes fitopatológicas que acometem coqueiros, dendezeiros e plantações de café; **frutícolas** - engloba flagelados de sementes e polpas de frutos de várias espécies de plantas; **floricólas** - refere-se aos tripanossomatídeos de flores encontrados no néctar de *Colchicus autumnalis* e em flores de abóbora, *Cucurbita moschata*.

De uma maneira geral, tripanossomatídeos de plantas que se apresentam sob a forma promastigota têm sido classificados como *Phytomonas spp.* Esta definição, no entanto, é no mínimo duvidosa por uma razão: tripanossomatídeos pertencentes aos gêneros *Crithidia*, *Herpetomonas* e *Leptomonas* podem ser recuperados de plantas como resultado de infecção transiente, sendo que os dois últimos gêneros compartilham formas promastigotas indistinguíveis de *Phytomonas* (CONCHON et al., 1989; CATARINO et al., 2001). Dessa forma, o hospedeiro de origem e a morfologia podem ser utilizados como características taxonômicas clássicas para tripanossomatídeos de insetos, mas não para *Phytomonas*.

Vários outros critérios taxonômicos foram descritos com o intuito de evitar estes questionamentos, entre eles: aglutinação com distintas lectinas (PETRY et al., 1987; SANCHEZ-MORENO et al., 1995); perfil de izoenzimas (GUERRINI et al., 1992; MULLER et al., 1994; FERNÁNDEZ - BECERRA et al., 1996); reatividade com anticorpos monoclonais (TEIXEIRA; CAMARGO, 1989; TEIXEIRA et al., 1995); análise do kDNA (AHOMADEGBE et al., 1990; CAMARGO et al., 1992; FERNÁNDEZ- BECERRA et al., 1996); análise da seqüência de genes ribossomais (MARCHÉ et al., 1995); utilização da seqüência do mini exon ou *spliced leader* RNA (SL-RNA) em reações de hibridação de DNA genômico (TEIXEIRA et al., 1996) e amplificação em cadeia pela polimerase (STURM et al., 1995; SERRANO et al., 1999a); perfil enzimático do ciclo da uréia (CATARINO et al., 2001). Alguns marcadores serão abordados sucintamente a seguir.

Os genes da seqüência líder ou minixon são de grande interesse para o diagnóstico de tripanossomatídeos, por incluírem seqüências que são absolutamente conservadas acopladas a regiões de extrema variabilidade. As regiões repetidas em tandem são úteis marcadores para a distinção entre gêneros e espécies da família *Trypanosomatidae*. Isto porque, como mencionado anteriormente, a SL-RNA é constituída por uma seqüência de aproximadamente 39 nucleotídeos extremamente conservada entre as espécies e diferente das seqüências de outras espécies. Além disso, no gênero *Phytomonas*, as regiões intergênicas

apresentam variabilidade entre os parasitas dos grupos do floema, látex e frutos e, desse modo, são úteis no estudo e caracterização do tropismo desses microrganismos aos tecidos dos hospedeiros vegetais (Sturm *et al.*, 1995). Em *Phytomonas*, os genes da seqüência líder e os que codificam RNA ribossomais (rDNA) têm mostrado um potencial valor taxonômico. Os rDNAs estão arranjados em subunidades repetidas em tandem; Marché e colaboradores (1995) estudando isolados de *Phytomonas* do fruto, látex e do floema, constataram a presença de sítios *EcoRI* específicos para os flagelados do floema, mas o mesmo sítio não foi encontrado nos isolados do látex e do fruto, e corroborando os resultados de Camargo e colaboradores (1992), nenhum sítio *PvuII* localizado a 360 pb a jusante da SSU foi observado.

Teixeira e colaboradores (1996) sintetizaram um oligonucleotídeo, designado SL3', complementar à região +40 a +58 do íntron da SL-RNA do gênero *Phytomonas* (Figura 10). Estudos anteriores revelaram que esta região é extremamente conservada entre os isolados de *Phytomonas* (Nunes *et al.*, 1995; Sturm *et al.*, 1995). Os 19 nucleotídeos da sonda SL3' hibridou exclusivamente com *Phytomonas* spp e resultados negativos foram obtidos com espécies de *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Leishmania* e *Trypanosoma*. Somado a isto, os resultados positivos obtidos com a sonda SL3' foram consistentes com anticorpos monoclonais específicos para *Phytomonas*, ausência de atividade arginase nestes flagelados, ausência do sítio *PvuII* na seqüência nucleotídica dos rDNAs e, finalmente, formas promastigotas características.

Serrano e colaboradores (1999b) descreveram uma metodologia rápida e fácil para diagnóstico de *Phytomonas* spp. Esses autores amplificaram por PCR o gene da seqüência líder desses a partir de esfregaços fixados com metanol e corados com Giemsa. Os amplicons foram hibridados com a sonda SL3' específica para *Phytomonas*, mostrando a especificidade da reação.

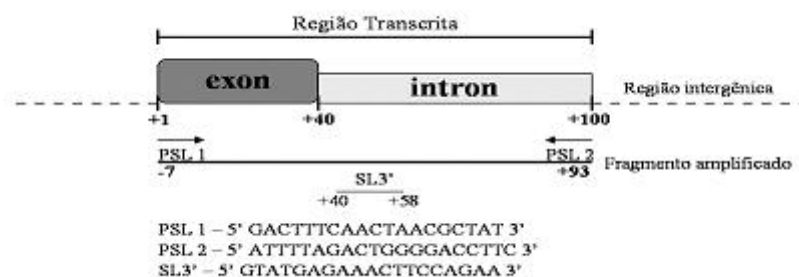


Figura 10 – Gene da seqüência líder ou miniexon de *Phytomonas*. Os oligonucleotídeos **PSL 1** e **PSL 2** são usados para amplificar a seqüência +40 a +58 de 19 nucleotídeos referente à sonda **SL3'**.

Fonte: Camargo (1999).

A atividade da enzima mitocondrial, isopropil álcool desidrogenase (iPDH) também pode ser utilizada como marcador bioquímico do gênero *Phytomonas*, uma vez que sua atividade não foi mostrada em outros gêneros da família Trypanosomatidae (UTTARO et al., 1997; MOLINAS et al., 2003).

Durante o crescimento exponencial, espécies do gênero *Phytomonas* utilizam preferencialmente glicose como fonte de carbono e energia (CHAUMONT et al., 1994). Como em outros tripanossomatídeos, esse substrato é degradado através da via de Embden-Meyerhof, na qual as primeiras reações ocorrem nos glicossomas (SANCHEZ-MORENO et al., 1992). A mitocôndria de *Phytomonas* sp não contém um ciclo de Krebs funcional [SANCHEZ-MORENO et al., 1992; CHAUMONT et al., 1994 (Figura 11)] e genes que codificam citocromo c oxidase e redutase não foram detectados nos maxicírculos do kDNA (MASLOV et al., 1999; NAWATHEAN; MASLOV, 2000). Contudo, o consumo de oxigênio é inibido por ácido salicílico hidroxâmico (SHAM), mostrando a presença de uma ubiquinol-oxigênio oxireductase, também conhecida como terminal oxidase alternativa (SANCHEZ-MORENO et al., 1992; VAN HELLEMOND et al., 1998).

Formas promastigotas de *Phytomonas* vivem e excretam hidrolases envolvidas na degradação de polissacarídeos das plantas hospedeiras, ocorrendo uma elevada taxa no consumo de monossacarídeos pelo parasita, como fonte de carbono e energia (SANCHEZ-MORENO et al., 1992; TIELENS; HELLEMOND, 1998). Os principais produtos finais do metabolismo da glicose nestes protozoários são etanol e acetato (CHAUMONT et al., 1994).

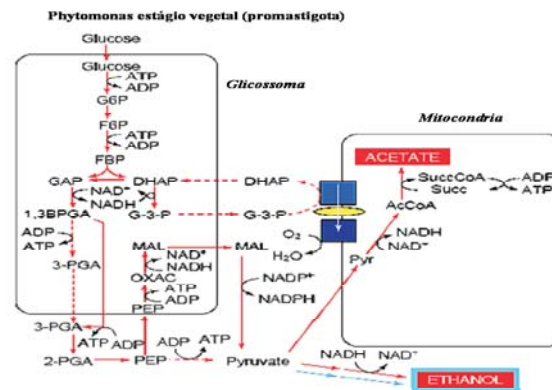


Figura 11 – Representação esquemática do metabolismo de glicose em *Phytomonas* spp. G6P (glicose 6-fosfato); F6P (frutose 6-fosfato); ATP (trifosfato adenosina); ADP (difosfato de adenosina); GAP (ácido fosfoglicérico); DHP (diidroxifosfato); OXAC (ácido oxalacético); MAL (ácido málico); PEP (ácido fosfoenolpirúvico); AcCoA (acetil coenzima A); BPGA (ácido difosfoglicérico); SuccCoA (succinil coenzima A); DHAP (diidroxiacetona fosfato); G-3-P (gliceraldeído 3-fosfato); NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo); NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida); NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato); NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida); FBP (frutose bifosfato); Pyr (ácido pirúvico); Succ (ácido succínico).

Fonte: Tielens & Hellemond (1998), modificado.

Finalmente, alguns trabalhos descrevem moléculas de superfície que parecem estar envolvidas com o estabelecimento da infecção/colonização de *Phytomonas* em seu hospedeiro. Redman e colaboradores (1995) detectaram a presença de glicoinositol fosfolipídeos (GIPLs) na superfície de *Phytomonas* spp isolados do látex de *Euphorbia characias*. Análises comparativas com outros tripanossomatídeos mostraram que esses glicolipídeos são muito similares às âncoras de proteínas GPIs (glicosil fosfatidil inositol). A função de GIPLs na superfície celular de *Phytomonas* spp, assim como de outros tripanossomatídeos parasitas, não foi ainda determinada, mas devido à abundante quantidade do glicolipídeo, sua função poderia estar diretamente relacionada com a proteção do parasita. Outra questão interessante deste trabalho foi a ausência de resíduos de galactose (Gal) nas GIPLs das *Phytomonas* spp estudadas. Esta constatação é pertinente, uma vez que os isolados analisados vivem no látex da planta, o qual contém lectinas específicas para Gal e, conseqüentemente, não podem promover a aglutinação do parasita. Isso sugere uma especificidade entre as GIPLs de *Phytomonas* e lectinas encontradas na planta hospedeira durante o processo de infecção.

Foi descrita a presença de ácido siálico na superfície de *Phytomonas* spp [*P. serpens*, *P. mcgheeii*, *P. françai* e *Phytomonas* spp (DOS SANTOS et al., 2002)]. A descrição

de sialoglicomoléculas tem sido correlacionada a diversos processos biológicos e patogênicos em tripanossomatídeos flagelados. No entanto, a função deste monossacarídeo em *Phytomonas* spp ainda tem que ser pesquisada.

Marín e colaboradores (2004) detectaram em *Phytomonas* spp, a atividade de superóxido dismutase de ferro 2 (SODI 2) a qual já havia sido encontrada em outros protozoários parasitas. Sua atividade tem sido considerada como um importante fator de virulência e com propriedades imunológicas; protegendo o parasita das defesas do hospedeiro (PARAMCHUCK et al., 1997; PÉREZ- FUENTES et al., 2003). Adicionalmente, SODI pode ser utilizado como um potencial marcador molecular para a identificação de tripanossomatídeos do gênero *Phytomonas*, já que soro anti-SODI 2 foi específico para *Phytomonas* spp, não apresentando reatividade com *T. cruzi*, *Leishmania donovani*, *Herpetomonas samuelpeessoai*, *Herpetomonas davidi*, *Crithidia luciliei* e *Leptomonas collosoma*.

Outras características específicas serão abordadas a seguir para cada espécie de *Phytomonas*.

1.3.1 Características gerais das espécies definidas de *Phytomonas*

1.3.1.1 *Phytomonas francai*

Este flagelado foi inicialmente encontrado no látex de plantas da família *Euphorbiaceae*, em *Manihot esculenta*, desencadeando um processo infeccioso aparente, conhecido como “chochamento das raízes” em mandiocas.

A infecção de raízes de plantas por *P. francai* tem como consequência a murcha e atrofia dessa região, acompanhada por clorose da parte aérea da planta, frequentemente acompanhada pela escassez ou ausência de amido (ROCHA et al., 2003). A transmissão do protozoário ocorre por insetos fitófagos do gênero *Lincus* ou *Ochlerus* (Hemiptera/ Pentatomidae).

Foi descrita a presença de quitina na superfície celular desses tripanossomatídeos (NAKAMURA et al., 1993). Este polissacarídeo também é encontrado na parede celular de alguns fungos e exoesqueleto de muitos invertebrados. É possível que a

quitina desempenhe um papel importante na proteção desses fitoflagelados e, ao mesmo tempo, um alvo para quitinases de plantas, sugerindo que as enzimas na planta representem um mecanismo de defesa contra fitopatógenos (ROCHA et al., 2003).

Almeida e colaboradores (2003) avaliaram a atividade proteolítica extracelular de *P. françai* e detectaram a presença de uma metaloproteínase. A função dessa protease ainda não foi determinada, mas alguns recentes estudos estão voltados para este objetivo, uma vez que a atividade destas proteases no processo de interação desse e de outros tripanossomatídeos com o hospedeiro pode ocorrer em níveis variados, que vão desde a assimilação de nutrientes até o estabelecimento da infecção.

1.3.1.2 *Phytomonas staheli*

P. staheli tem sido descrito como um potencial patógeno de dendezeiro (*Elaeis guineensis*) e coqueiros (*Cocos nucifera*), os quais desencadeiam sintomas patológicos na planta conhecidos como “marchitez sorpressiva” e “hartrot”, respectivamente. Insetos do gênero *Lincus* são os vetores desses flagelados. Esses tripanossomatídeos desencadeiam um processo infeccioso similar em coqueiros e dendezeiros em todas as partes da planta, com uma fase aguda caracterizada por murchas letais. O quadro apresentado pela planta caracteriza-se por escurecimento das folhas; inflorescências e frutos caem antes de amadurecerem e a árvore morre dentro de 10 semanas (CAMARGO, 1999).

1.3.1.3 *Phytomonas leptovosorum*

P. leptovosorum é um parasita do floema em raízes do cafeeiro. Este tripanossomatídeo multiplica-se intensamente no local parasitado e está associado a uma síndrome bem definida conhecida como necrose do floema do café. O processo infeccioso pode avançar em duas formas características: 1) na forma aguda, o cafeeiro seca e morre em um período de dois meses; 2) na forma crônica, em um período máximo de um ano, ocorre o amarelamento e queda das folhas, com os galhos da planta nitidamente flácidos (CAMARGO, 1999).

1.3.1.4 *Phytomonas mcgheeii*

P. mcgheeii é descrito como parasita do milho (*Zea mays*) e, caracteristicamente como verificado em frutos e sementes infectados por tripanossomatídeos, a infecção permanece restrita ao local de inoculação e não se dissemina a outros órgãos. A transmissão desse flagelado é realizada pelo inseto vetor *Veneza zonata* (CAMARGO, 1999).

1.3.1.5 *Phytomonas serpens*

P. serpens é um tripanossomatídeo isolado do tomate (JANKEVÍCIUS et al., 1989) e facilmente cultivado em meio complexo GYPMI (ITOW-JANKEVÍCIUS et al., 1993). Esses flagelados apresentam um notável polimorfismo no comprimento do corpo celular. Jankevicius e colaboradores (1989) observaram uma variação no comprimento de formas promastigotas recuperadas do intestino do inseto vetor (4.1 e 16 μm), dos túbulos de Malpighi (5.6 μm) e das glândulas salivares (5.7, 24 e 80 μm). Em cultura em fase exponencial de crescimento foi observado predominantemente formas com 10 μm de comprimento, alongadas e sem torções no corpo, e formas promastigotas de 60 μm (sem levar em consideração o flagelo) foram encontradas na fase estacionária, exibindo torções do corpo.

Jankevicius e colaboradores (1989) determinaram o ciclo biológico desses parasitas de frutos utilizando tomate (*Lycopersicon esculentum*) experimentalmente infectado e insetos *Phytia picta* e *Nezara viridula*. Os insetos alimentam-se dos frutos parasitados, tornando-se infectados pela via digestiva; esses flagelados colonizam o trato digestivo dos insetos, avançam a barreira intestinal e atingem as glândulas salivares através da hemolinfa; completando o ciclo com a transmissão de formas promastigotas típicas de *Phytomonas* pela saliva do inseto durante seu repasto alimentar (Figura 12). Esses tripanossomatídeos permanecem concentrados no local de inoculação, onde ocorre a picada pelo inseto vetor (Figura 13).

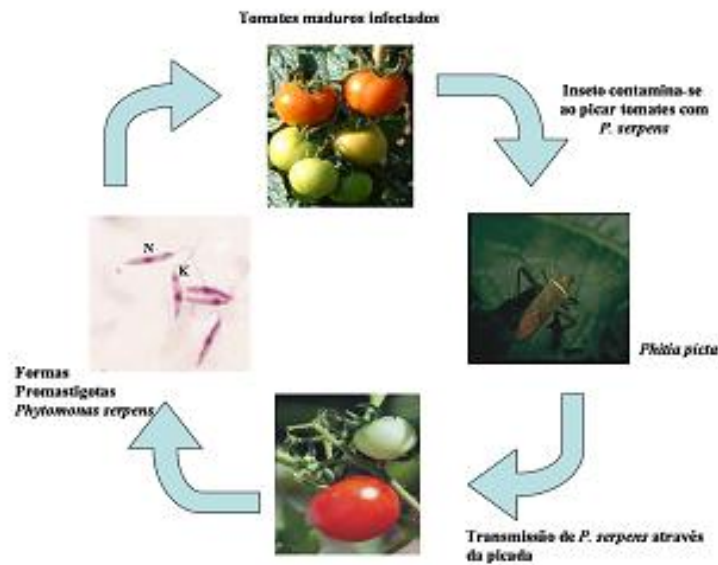


Figura 12 – Ciclo biológico de *P. serpens*. O inseto vetor contamina-se pela via digestiva ao picar tomates maduros infectados com *P. serpens*. Tomates tornam-se infectados quando o inseto contaminado se alimenta do fruto, transmitindo o tripanossomatídeo pela saliva no momento da picada.



Figura 13 – A: frutos do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) infectados com *Phytomonas serpens*; B: ponto de inoculação, mostrando o sinal da picada do vetor.

Como em outras espécies do gênero *Phytomonas*, em *P. serpens* os genes que codificam para citocromo c oxidase e redutase estão ausentes de seus maxicírculos. Ainda não está claro se este estado de inativação mitocondrial é permanente ou se ocorre em algum momento do ciclo biológico do parasita (MASLOV et al., 1998; MASLOV et al., 1999; NAWATHEAN; MASLOV, 2000). No entanto, Maslov e colaboradores (1998) mostraram que moléculas de gRNA participam do processamento do mRNA que codifica para a proteína ribossomal S12 (RPS12) mitocondrial, indicando que a transcrição do kDNA está ativa.

Alguns microrganismos exibem moléculas de carboidratos como componentes de glicoconjugados localizados na superfície celular que podem estar envolvidos

na interação do parasita com o hospedeiro. Em *P. serpens* foi verificado que alguns monossacarídeos como arabinose, manose e galactose estão presentes na superfície celular do parasita (ABREU-FILHO et al., 2001) podendo ter um efetivo papel na interação com a planta hospedeira (GAZZINELLI et al., 1991).

Recentemente, foi mostrada a atividade de cisteína peptidase em *P. serpens* (SANTOS et al., 2006). Esses autores mostraram que anticorpos policlonais contra cruzipaina, a principal cisteína protease de *T. cruzi*, reconhecem a cisteína peptidase de *P. serpens* - amostra 9T. A ação de peptidases em microrganismos patogênicos tem recebido atenção especial como alvos quimioterápicos uma vez que estas enzimas estão envolvidas com a sobrevivência e crescimento dos parasitas em seus hospedeiros. A atividade peptidase tem sido verificada em microrganismos fitopatogênicos e correlacionada com a severidade das doenças nas plantas hospedeiras, representando um importante mecanismo utilizado no estabelecimento da infecção (MOSOLOV et al., 2001). Em *P. serpens*, alguns processos biológicos como crescimento celular e interação com o inseto vetor parecem ser dependentes da expressão da enzima (Santos et al., 2006).

Também D'Avila-Levy e colaboradores (2006) descreveram a presença de uma metalopeptidase com localização na superfície celular de *P. serpens*. Essa proteína é reconhecida por anticorpos policlonais anti-gp63 de *Leishmania amazonensis* e sua provável função está relacionada com a sobrevivência intracelular e interação parasita-hospedeiro.

Muitos avanços na compreensão da biologia desses tripanossomatídeos só foram possíveis após o cultivo eficiente *in vitro* na década de 80. No entanto, não seria um exagero dizer que em ciência não faz tanto tempo assim e, conseqüentemente ainda muitos estudos bioquímicos, metabólicos e genéticos desses parasitas de plantas são necessários.

1.4 *Trypanosoma cruzi* E A DOENÇA DE CHAGAS

T. cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas (CHAGAS, 1909), a qual é endêmica na América do Sul e Central. A doença afeta 18 milhões de pessoas na atualidade, sendo que praticamente 100 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas (WHO, 2002).

O ciclo de vida de *T. cruzi* é heteroxênico, apresentando estágios morfológicos entre vetores invertebrados, e em hospedeiros vertebrados, incluindo humanos. Os mais importantes vetores de *T. cruzi* são os insetos hematófagos: *Triatoma infestans*,

Rhodnius prolixus e *Panstrongylus megistus*, todos pertencentes à sub-família Triatominae, família Reduviidae e ordem Hemiptera (BARRETT et al., 2003).

Durante todo o ciclo biológico do parasita, diferenças morfológicas e fisiológicas são evidenciadas como resultado de diferenciações que ocorrem no vetor e no hospedeiro vertebrado. Inicialmente, durante seu repasto alimentar o inseto ingere formas tripomastigotas sanguíneas (forma não replicativa e infectiva) que sofrerão a primeira diferenciação no intestino médio do inseto, transformando-se em epimastigotas. No trato digestivo do vetor, ocorre a segunda diferenciação; as formas epimastigotas após intensa multiplicação por fissão binária se transformam em tripomastigotas metacíclicos, no intestino posterior. Estas formas infectivas para o hospedeiro vertebrado são liberadas pelo vetor junto com as fezes e urina, durante seu repasto sanguíneo. As formas tripomastigotas liberadas penetram pelo local da picada ou através das mucosas e infectam células nucleadas locais, transformando-se em amastigotas, que aí se multiplicam por divisão binária simples. Ocorre na seqüência a diferenciação das amastigotas em tripomastigotas que são liberadas das células e alcançam a corrente sanguínea ou outras células adjacentes. Os tripomastigotas através da corrente sanguínea invadem células de qualquer tecido ou órgão para desenvolver novo ciclo celular. O ciclo pode reiniciar-se com o inseto vetor ingerindo as formas tripomastigotas sanguíneas (GARCIA; AZAMBUJA, 1991; TYLER; ENGMAN, 2001).

Na fase aguda da doença, as manifestações clínicas são variáveis em frequência e intensidade, ocorrendo de 6 a 10 dias após o início da infecção, permanecendo até dois meses depois. Frequentemente ocorre um edema ocular aparente, bipalpebral no local da infecção, conhecido como sinal de Romana. Se a entrada do parasita ocorre em outro local que não a região ocular, a inflamação cutânea local seguida por um inchaço da pele é conhecida como chagoma de inoculação. Outros sintomas podem ser observados na fase aguda como febre, edema subcutâneo, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, além de uma miocardite difusa. A morte nesta fase acontece em poucos casos e geralmente é decorrente de meningoencefalite e insuficiência cardíaca (RASSI et al., 2000; BARRETT et al., 2003).

A fase crônica da doença de Chagas é marcada por dois momentos distintos: 1) a forma indeterminada da fase crônica e; 2) a forma crônica cardíaca e forma crônica digestiva. Após a fase aguda, os pacientes passam por um período assintomático, com ausência de manifestações clínicas, cardíacas ou digestivas. Este período da fase crônica é denominado de forma indeterminada da doença, na qual muitos pacientes podem permanecer indefinidamente e outros (15% a 30% dos pacientes) podem evoluir para a forma crônica cardíaca ou digestiva, em um período de 10 a 25 anos depois do início da infecção. Durante

tudo o período da forma indeterminada, a morte súbita é mais comum de acontecer (BARRETT et al., 2003).

1.4.1 Resposta imunológica na infecção experimental por *T. cruzi*: uma visão geral

Todo patógeno precisa evadir-se das defesas imunológicas do hospedeiro para conseguir sobreviver e, conseqüentemente, estabelecer a infecção. Na doença de Chagas isto não é diferente, e já no início da infecção, a defesa do hospedeiro apresenta-se ativamente funcional.

Na imunidade celular inata, a citocina interferon gama (IFN- γ) tem sido importante na proteção *in vivo*, no estágio inicial da infecção aguda por *T. cruzi*. Estudos mostram que esta citocina ativa macrófagos infectados, inibindo a multiplicação do parasita por mecanismos que envolvem a produção de óxido nítrico (NO) (VESPA et al., 1994). Algumas citocinas que minimizam o efeito do IFN- γ são também detectadas no início da fase aguda. A interleucina (IL)-10 é uma dessas citocinas, envolvidas juntamente com outras citocinas no bloqueio da função de macrófagos, inclusive sua atividade intracelular anti *T. cruzi*. Uma questão que deve ficar clara é o fato de que as respostas são dinâmicas e qualquer variação na cepa do parasita, inóculo e /ou mudança quanto à susceptibilidade do hospedeiro irão refletir na resposta imunológica (DOS REIS, 1997).

De qualquer forma, é fato que no início da fase aguda, tripomastigotas são simultaneamente, potentes iniciadores de uma defesa voltada para a proteção do hospedeiro, mediada pela produção de IL-12 e INF- γ (DA SILVA; ABRAHAMSOHN, 2001) e uma mediada por produção de IL-10, que apesar de ser direcionada para proteger o hospedeiro dos efeitos prejudiciais de uma resposta intensificada, termina beneficiando o parasita. Todos esses efeitos antagônicos exercem um papel na severidade da infecção. Finalmente, com o avanço da fase aguda, ocorre uma intensa ativação policlonal de linfócitos T e B, ocorrendo no final desta fase uma produção significativa de anticorpos específicos contra o parasita (MINOPRIO et al., 1986a,b ; MINOPRIO et al., 1989a,b).

A resposta imunológica mediada por células T CD4 e T CD₈ durante a fase aguda garante o controle da carga parasitária e sobrevivência do hospedeiro por meio da produção de citocinas que modulam as atividades tripanocidas de macrófagos e a produção de

anticorpos líticos por linfócitos B (BRENER; GAZZINELLI, 1997). Os linfócitos T CD8, por sua vez, têm uma função precisa no início da infecção, provavelmente pelo fato de que muitas células invadidas por tripomastigotas expressam antígenos de *T. cruzi* via o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I na superfície celular e, conseqüentemente, sofrem os efeitos das propriedades biológicas dessas células (DOS REIS, 1997).

Um outro evento pertinente na fase aguda é a intensa e progressiva supressão da resposta linfoproliferativa, largamente mediada pela produção de óxido nítrico, prostaglandinas (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1995; PINGE-FILHO et al., 1999; MICHELIN et al., 2005), diminuição da síntese de IL-2 e redução da expressão de receptores de IL-2 nos linfócitos (RAPPAPORT; DODGE, 1982; KRAUSE; DEUTSCH, 1991). Isto é contraditório, uma vez que essa mesma fase também é marcada por intensa ativação policlonal de células B e T. É plausível que todo esse mecanismo imunoregulatório, seguido por extensiva ativação da resposta imunológica, seja uma alternativa do hospedeiro para encontrar um equilíbrio nesse ‘disparo’ de reações. Por outro lado, esse mesmo mecanismo acaba favorecendo a evasão imunológica de *T. cruzi* e, conseqüentemente, a entrada na fase crônica da doença.

1.4.2 Tratamento na doença de Chagas

Muitos avanços foram conseguidos no controle da transmissão vetorial e transfusional da doença de Chagas. Em países como o Uruguai, Chile, Brasil e Argentina, o principal vetor da doença, *Triatoma infestans* está sob controle; e uma avaliação rigorosa de bancos de sangue tem diminuído a transmissão e contribuído para uma melhora considerável no quadro de pessoas com risco de contaminação (URBINA; DOCAMPO, 2003). No entanto, um outro problema no tratamento, prevenção e erradicação da doença de Chagas é a resistência aos fármacos utilizados na clínica médica.

A quimioterapia disponível até o momento, nifurtimox e benzonidazol, apresenta uma limitada eficácia na fase crônica da doença, além de ser muito pouco tolerada por seus efeitos tóxicos. O uso do nifurtimox, no entanto, está proibido no Brasil. Essas drogas afetam formas tripomastigotas do sangue e formas amastigotas em diversos tecidos do hospedeiro (RAETHER; HÄNEL, 2003). A cura, por outro lado, depende da sensibilidade das cepas de *T. cruzi*, uma vez que existe uma grande variabilidade genética das populações de

parasitas (BRENER; CHIARI, 1967), além da existência de cepas naturalmente resistentes às drogas (FILARDI; BRENER, 1987), o que pode estar relacionado à origem geográfica das mesmas (MURTA et al., 1998). Outras questões também devem ser levadas em consideração como o estágio da doença e fisiologia do hospedeiro (MAYA et al., 1997; VELOSO et al., 2001). O desenvolvimento de novas drogas alternativas ao nifurtimox e benzonidazol, seguras, com compostos tripanocidas mais eficazes e baixa toxicidade para o homem tem sido o maior desafio.

A utilização de produtos naturais na busca de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas oferece a oportunidade de descobrir novos compostos com potencial atividade e seletividade (KAYSER et al., 2003; SULSEN et al., 2006). O uso de produtos naturais extraídos de plantas (BERGER et al., 1998; MUELAS-SERRANO et al., 2000; ABE et al., 2002, 2005; IGWEH et al., 2002; SCHINELLA et al., 2002; UCHIYAMA et al., 2002; LIRUSSI et al., 2004; DANTAS et al., 2006; LUIZE et al., 2006) com baixa toxicidade e potencial atividade anti oxidante tem sido constantemente utilizados em testes para avaliação tripanocida.

Alguns trabalhos têm avaliado os efeitos biológicos de extratos (HOLETZ et al., 2005) e quitinases (ROCHA et al., 2003) de plantas sobre tripanossomatídeos inferiores, como *Herpetomonas samuelpessoai* e *Phytomonas françai*, respectivamente. O uso de tripanossomatídeos inferiores como modelos biológicos no “*screening*” de novas drogas tripanocidas justifica-se por apresentarem características biológicas similares a membros potencialmente patogênicos da família Trypanosomatidae, por não serem patogênicos e por serem facilmente cultivados em meios sintéticos.

Bisaggio e colaboradores (2006) testaram o efeito de suramin, um derivado simétrico da uréia em tripomastigotas de cultura de tecidos. Os parasitas exibiam um desligamento parcial ou completo do flagelo da superfície do corpo com acentuada diminuição da motilidade do parasita, além da diminuição do comprimento e largura do corpo do protozoário (Figura 14). Este composto tem sido descrito como inibidor de enzimas celulares, tais como aquelas da via de biossíntese e distribuição de proteínas do citoesqueleto e inibição da endocitose de algumas moléculas, além de interferir na divisão celular (FAIRLAMB; BOWMAN, 1980; VOOGD et al., 1993).

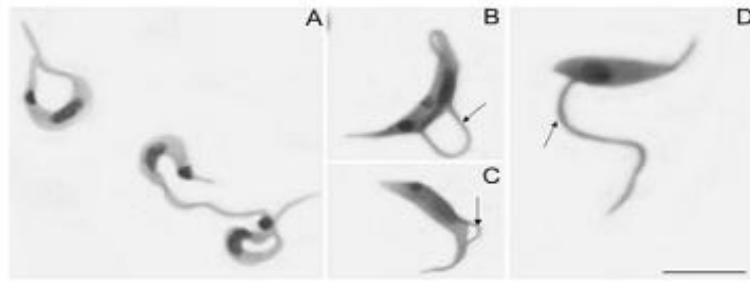


Figura 14 – Efeito de suramin em tripomastigotas. Tripomastigotas corados com Guemsa (A) e cultivo dos parasitas na presença de 500μM de suramin (B-D). É possível observar que após tratameto com suramin algumas células apresentam partes do flagelo (B e C) ou todo o flagelo (D) desligado do corpo celular (flecha).

Fonte: Bisaggio *et al.* (2006).

Luize e colaboradores (2006) mostraram a atividade tripanocida *in vitro* do extrato da planta *Piper regnellii*, popularmente conhecida como “Pariparoba”. Um dos compostos puros analisados extraídos de *P. regnellii*, mostrou ser mais efetivo que o benzonidazol na inibição do crescimento em epimastigotas de cultura, além da baixa toxicidade sobre células Vero e não causar a lise de células sanguíneas.

Uma avaliação utilizando o extrato etanólico de *Bulgarian propolis* (Et-Blg) foi realizada por Dantas e colaboradores (2006) em camundongos *Swiss* infectados com *T. cruzi*. O tratamento de camundongos infectados com Et-Blg diminuiu a parasitemia e não mostrou efeitos tóxicos nos animais, mas não interferiu com a mortalidade.

1.4.2.1 Mecanismo de ação do nifurtimox e benzonidazol

Nifurtimox e benzonidazol quando administrados no tratamento da doença de Chagas agem como drogas tripanocidas por induzir a formação de radicais livres e metabólitos eletrofílicos [(Figura 15) (MAYA et al., 2006)]. Durante o processo, nitroreduases agem na redução de grupos nitro de ambas as drogas para grupos amino, resultando na formação de diversos radicais livres intermediários e metabólitos eletrofílicos. A reação é catalizada por P-450 NADPH-citocromo redutase, que age no grupo nitro de moléculas tipo R-NO₂, produzindo um radical nitro ânion (R-NO₂⁻). Este radical formado reage com o oxigênio molecular, o qual é parcialmente reduzido, reconstituindo a droga. Em seguida ocorre a formação de O₂ e H₂O₂ por ação da SOD sobre o ânion superóxido (O₂⁻). Este ânion e H₂O₂, na presença de Fe³⁺,

forma radical hidroxila, principalmente OH, o qual se complexa com macromoléculas, tais como lipídios, proteínas e DNA, causando danos a célula como: peroxidação lipídica, destruição de membranas, danos ao DNA, inativação enzimática, além de poder apresentar efeitos tóxicos aos tecidos do hospedeiro. Todo esse processo descrito é o principal mecanismo de ação do nifurtimox contra *T. cruzi* (MAYA et al., 2006).

Uma outra provável ação do nifurtimox é na inibição da tripanotona redutase e conseqüentemente, a inibição da capacidade de detoxificação (RAETHER; HÄNEL, 2003; MAYA et al., 2003; DOCAMPO, 1990), uma vez que realiza um papel antioxidante (Fairlamb et al., 1992) como a glutatona em células de mamíferos. *T. cruzi* é muito sensível aos danos celulares causados por metabólitos gerados pelo nifurtimox e benzonidazol, já que enzimas responsáveis pela eliminação dos radicais livres estão ausentes ou possuem baixa atividade durante todo o ciclo de vida do parasita (MAYA et al., 2006).

No tratamento com benzonidazol, é provável que o mecanismo tripanocida seja devido a ligação covalente de metabólitos reduzidos a macromoléculas, e não por espécies reativas do oxigênio como acontece no tratamento com nifurtimox, uma vez que as concentrações inibitórias de O_2 e H_2O_2 sobre epimastigotas, não tem sido observadas. Além da ação tripanocida atribuída a metabólitos da droga que provavelmente inibem a atividade da enzima tripanotona e vários tipos de radicais livres similares ao encontrados no uso do nifurtimox, causando danos ao DNA e inibição da síntese de RNA e proteínas (Figura 15). Tem sido descrito também (ROMANHA et al., 2002; TURRENS et al., 1996) que o efeito tripanocida do benzonidazol possa ser devido à melhora no processo de fagocitose, na ação de IFN- γ causando um aumento significativo de morte do parasita, e inibição da NADH-fumarato redutase de *T. cruzi*.

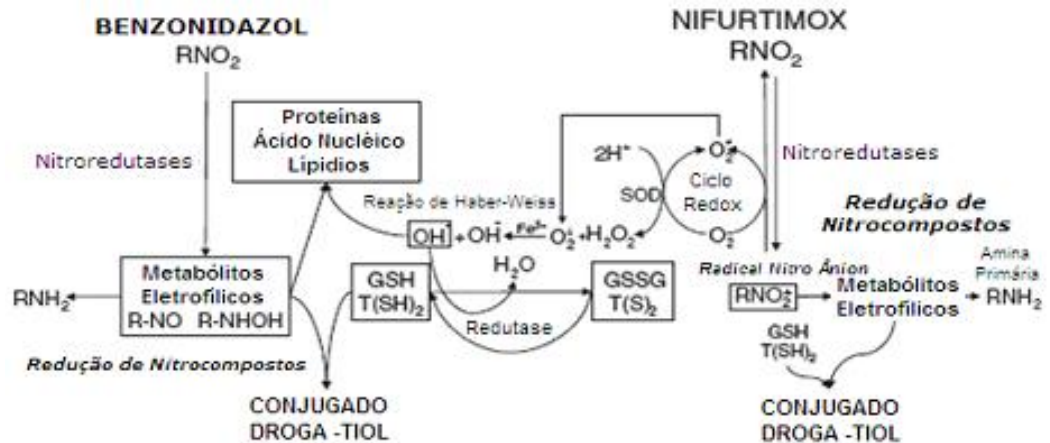


Figura 15 – Papel da glutatona e tripanotona na ação e metabolismo das drogas tripanocidas nifurtimox e benzimidazol. O nitro grupo (moléculas tipo $R-NO_2$) de ambas as drogas é reduzido para radicais livres ou metabólitos eletrofilos por ação de nitroredutases. Radicais livres derivados do nifurtimox podem sofrer um ciclo redox com o oxigênio e produzir H_2O_2 por ação da superóxido dismutase (SOD). O oxigênio produzido derivado dos radicais livres e metabólitos eletrofilos liga-se a macromoléculas intracelulares causando danos à célula. No parasita, a tripanotona ($T(SH)_2$ em tripanosomatídeos e a Glutaciona (GSH) em células de mamíferos neutralizam os metabólitos derivados do benzimidazol e nifurtimox por conjugação produzindo conjugados droga-tiol que possivelmente sejam metabolizados Mercaptures no hospedeiro mamífero.

Fonte: Maya *et al.* (2006).

O tratamento com nifurtimox no início da fase aguda é longo, exigindo entre 90 e 120 dias consecutivos de administração oral da droga, com doses de 8-10mg/kg por peso corporal (em crianças, de 15-20mg/kg), para a cura da infecção. Após a administração oral, o nifurtimox é bem absorvido, biotransformado, possivelmente via pré-sistêmica, gerando alguns metabólitos não identificados e com concentrações menores que 0,5% encontrados na urina. Os sintomas mais frequentes relacionados ao uso da droga são: náuseas, vômitos, mialgia, febre, dermatite, icterícia, infiltração pulmonar, anafilaxia e fraqueza. Sintomas menos frequentes são: dores de cabeça, polineurites, desordens psíquicas, leucopenia e supressão de espermatogênese, bem como, reações imunológicas mediadas por células (RAETHER; HÄNEL, 2003; MAYA *et al.*, 2006).

No tratamento com benzimidazol a dose recomendada na fase aguda é de 5-7,5mg/kg/dia por 90 dias consecutivos. Somente em casos de infecção acidental ou infecções presumidas como: por vetores, transfusões sanguíneas, ou contaminação em laboratório, a duração do tratamento profilático é limitado entre 10 e 15 dias consecutivos (MAYA *et al.*,

2006). Somente 20% da droga excretada na urina continua igual a inicialmente administrada, sendo o restante eliminado após ser biotransformado no fígado (RAETHER; HÄNEL, 2003).

Maya e colaboradores (2003) avaliaram a eficácia de derivados nitrofuranos e nitroimidazólicos sobre *T. cruzi*. O composto mais ativo da série encontrado foi o megazol [1-metil-2-(5-amino-1,3,4-tiadiazol)-5-nitroimidazol], um derivado nitroheterocíclico com atividade antibacteriana e contra tripanossomas. A ação combinada do megazol com suramin ou melazorprol (JENNINGS et al., 1996) potencializou o efeito tripanocida no tratamento de infecções com *Tripanosoma brucei*. Este composto provavelmente age na captura do grupo tiol de tripanotiona, o cofator para tripanotiona redutase, enzima essencial nos processos de detoxificação.

1.4.3 Perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas: exemplos de alvos potenciais no parasita

1.4.3.1 “Old yellow enzyme from *T. cruzi*” (TcOYE)

A “old yellow enzyme from *T. cruzi*” (TcOYE) tem sido investigada como um promissor alvo para a ação de drogas tripanocidas. Esta enzima já foi identificada também em leveduras, plantas e bactérias (WILLIAMS; BRUCE, 2002), mas não em animais. TcOYE cataliza a síntese de prostaglandina PGF₂ α e reduz uma variedade de drogas tripanocidas (KUBATA et al., 2002; MURTA et al., 2006).

1.4.3.2 Tripanotiona redutase

Outro promissor alvo para a ação de drogas tripanocidas é a via de biossíntese da tripanotiona, uma enzima exclusivamente encontrada em tripanossomatídeos, que atua na eliminação de radicais livres e na conjugação e detoxicação de numerosas drogas. A inibição desta via chave do parasita pode significar maior sensibilidade a ação tóxica do nifurtimox e benzonidazol, sem interferir significativamente no metabolismo do hospedeiro (MAYA et al., 2006).

1.4.3.3 Metabolismo de purinas

T. cruzi não sintetiza purinas durante seu metabolismo, no entanto, o parasita é capaz de condensar pirazolopirimidinas dentro da célula e metabolizá-las como purinas por meio de uma via de resgate, sendo depois incorporadas ao ácido nucléico. Este mecanismo no metabolismo de purinas não ocorre em mamíferos e, portanto, tem sido utilizado para o desenvolvimento de pesquisas envolvendo a quimioterapia na doença de Chagas.

1.4.3.4 Via de biossíntese do ergosterol

A via de biossíntese de esteróis tem sido avaliada como alvo para drogas contra *T. cruzi*, pois este compartilha com os fungos a necessidade do ergosterol para a manutenção da membrana citoplasmática. A inibição da biossíntese de ergosterol em *T. cruzi* é seletiva, pois, difere da via de biossíntese de colesterol das células de mamíferos. Drogas utilizadas no tratamento de infecções fúngicas, como cetoconazol e posoconazol, atuam na inibição de C14 α esterol demetilase dependente de citocromo P-450, ocorrendo um acúmulo de 14- α - metil esterol que é muito tóxico para sistemas enzimáticos que se ligados às membranas, como o sistema de transporte de elétrons (DOCAMPO, 2001; URBINA, 1997; MAYA et al., 2006). Estes e outros triazoles (como ravuconazol) mais efetivos contra *T. cruzi* estão sendo avaliados.

1.4.3.5 Cinetoplasto e edição do RNA

Como mencionado anteriormente os tripanossomatídeos apresentam kDNA, que replica-se por um mecanismo peculiar. Inibidores de topoisomerasas têm mostrado atividade tripanocida e habilidade para romper o cinetoplasto (SHAPIRO; ENGLUND, 1995). O processo de edição de RNA apesar de não ser exclusivo de tripanossomatídeos, mostra-se como um potencial alvo para drogas contra *T. cruzi* por ser um mecanismo extraordinário que envolve a adição ou deleção de resíduos de U para transcritos primários, necessários para o processamento do mRNA e tradução (STUART et al., 1997).

1.4.3.6 Outras enzimas

A trans-sialidase em tripomastigotas de *T. cruzi*, atua efetivamente na transferência de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para glicoproteínas de superfície do parasita, especialmente as mucinas (FRASCH, 2000). Esta enzima não é encontrada nos mamíferos e é essencial para o parasita no processo de invasão do hospedeiro. Outra enzima exclusiva do *T. cruzi*, a cruzipaina, é a maior cisteína protease do parasita, importante na relação parasita/hospedeiro (CAZZULO et al., 2001; CAZZULO, 2002). Os processos celulares essenciais ao parasita em que estas enzimas estão envolvidas e a ausência de atividade no homem, fazem com que sejam promissores alvos para o desenvolvimento de novos fármacos contra a doença de Chagas.

1.4.3.7 Considerações finais

Significativos avanços foram conseguidos até o momento no controle da transmissão vetorial e por transfusão sanguínea na doença de Chagas, mas este quadro não diminui a gravidade desta enfermidade, pois milhões de pessoas já estão infectadas. Neste contexto, a necessidade de um tratamento eficaz durante todas as fases da doença e com baixa toxicidade são os principais desafios na descoberta de novas drogas.

O “*screening*” “*in vitro*” e em modelos experimentais de infecção de substâncias tem um promissor desafio na descoberta de novas drogas com potencial efeito anti *T. cruzi*, que poderiam substituir o nifurtimox e benzonidazol.

1.5 REATIVIDADE IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Em 1926, Noguchi realizou alguns testes sorológicos com o objetivo de diferenciar tripanossomatídeos inferiores de insetos, do gênero *Herpetomonas* e várias espécies de *Leishmania*. Estes experimentos revelaram uma série de reações cruzadas entre as amostras analisadas. A partir desses estudos, vários experimentos (SOUZA; ROITMAN (1971);

VATTUONE; YANOVSKY, 1971; LOPES et al., 1981; GRAÇA; JANKEVICIUS, 2002; BREGANÓ et al., 2003; PINGE-FILHO et al., 2005) posteriores revelaram resultados similares, corroborando aqueles obtidos por Noguchi.

Em uma tentativa de mostrar a ocorrência de reação cruzada entre membros da família Trypanosomatidae, Souza e Roitman (1971) imunizaram camundongos com formas de cultura de tripanossomatídeos de insetos do gênero *Leptomonas* e posteriormente infectaram com doses letais de tripomastigotas de *T. cruzi*. Foi observado uma proteção parcial desses animais, devido à redução de tripomastigotas sanguíneos e um aumento significativo da sobrevivência quando comparados aos controles não imunizados.

Outros estudos utilizaram soros de pacientes com doença de Chagas (VATTUONE; YANOVSKY, 1971; LOPES et al., 1981) em reações imunológicas utilizando tripanossomatídeos de insetos. Todos os resultados obtidos corroboraram as descrições anteriores que mostravam a reatividade cruzada entre tripanossomatídeos.

A ocorrência de antígenos comuns entre tripanossomatídeos também foi verificada entre membros distantes da família Trypanosomatidae, entre parasitas de plantas e humanos (GRAÇA; JANKEVICIUS, 2002). Nesse trabalho, linfócitos de camundongos BALB/c foram coletados após prévia imunização com *P. serpens* e utilizados em ensaios de linfoproliferação com antígenos de *T. cruzi*. Os resultados mostraram um elevado índice de estimulação dos linfócitos, revelando que a resposta imunológica desencadeada nos animais com *P. serpens*, reagiu com antígenos heterólogos *in vitro*.

Mais recentemente, soro de pacientes com doença de Chagas mostrou ser reativo com *P. serpens* por ensaios imunológicos convencionais. Nesse trabalho, camundongos imunizados previamente com *P. serpens*, por via oral e intraperitoneal, foram desafiados com um inóculo letal de formas sanguíneas de *T. cruzi*. Os animais tiveram significativo aumento da sobrevivência e diminuição considerável de tripomastigotas sanguíneos quando comparados com o controle (BREGANÓ et al., 2003), corroborando trabalhos anteriores (SOUZA; ROITMAN, 1971; VATTUONE; YANOVSKY, 1971; LOPES et al., 1981). A princípio, estes resultados podem não parecer tão surpreendentes, já que são parasitas pertencentes à mesma família e, portanto, apresentam características em comum. Mas interessante foi o grau de proteção obtido contra a infecção por *T. cruzi* em camundongos considerados altamente susceptíveis.

Pinge-Filho e colaboradores (2005) mostraram que o óxido nítrico (NO) tem um papel essencial no controle da parasitemia associado à imunização com *P. serpens*, a qual reduziu a carga parasitária e a mortalidade em camundongos infectados por *T. cruzi* na fase

aguda da doença. No entanto, animais em que a produção endógena de NO foi reduzida, a imunização por via oral com *P. serpens* não mostrou ser benéfica. Por outro lado, os animais controles, em que a via de síntese de NO foi suprimida e não foram imunizados com *P. serpens*, apresentaram exacerbada parasitemia, com 100% de mortalidade. Um aspecto interessante nesse trabalho é que a imunização com *P. serpens* não induziu a formação de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco, mesmo após desafio com *T. cruzi*. Entretanto, em animais imunizados e desafiados ocorreu uma redução significativa no número de ninhos de amastigotas. Os autores sugerem que a imunização por via oral “primou” a resposta imunológica do hospedeiro, ou seja, ativou o sistema imunológico, intensificando a resposta mediada por células, possivelmente via formação de células T de memória.

Uma descrição interessante foi feita com relação à presença de uma proteína de 24-kDa em muitos membros da família Trypanosomatidae, inclusive *P. serpens* e *T. cruzi*, sendo caracterizada neste último como uma proteína flagelar ligante de cálcio [FCaBP (MALDONADO et al., 1997)]. Soros de pacientes com doença de Chagas reagiram com esta proteína em reações do tipo *Western blot*, obtendo uma elevada especificidade e sensibilidade (UMEZAWA; SILVEIRA, 1999). Análises por *Southern blot* revelaram que seqüências de FCaBP são encontradas em *Trypanosoma conorhini*, *Trypanosoma freitasi*, *Trypanosoma lewisi*, *Herpetomonas megaseliae*, *Leptomonas seymouri* e *Phytomonas serpens*. O mesmo entretanto, não foi observado em *Crithidia deanei*, *Leishmania (L) amazonensis* e *Endotrypanum schaudini* (MALDONADO et al., 1997), mostrando mais uma vez, que *T. cruzi* e *P. serpens* compartilham antígenos que reagem com anticorpos de pacientes chagásicos.

Resultados recentes mostraram que a seqüência de aminoácidos de calmodulina (CAM) de *P. serpens* 15T (CAMP) apresenta alta similaridade com CAM de outros organismos, inclusive *T. cruzi* (SOUZA; YAMADA-OGATTA, 2006). CAM é uma molécula sensora de cálcio multifuncional, que participa de diversos processos celulares, modulando a atividade de diferentes proteínas (LI et al., 2004). Em *T. cruzi*, essa proteína parece estar envolvida no movimento flagelar (OGUETA et al., 1994; RIDGLEY et al., 2001) e diferenciação celular (ORR et al., 1992; LAMMEL et al., 1996). Contudo, sua participação na reatividade cruzada com *T. cruzi* ainda está sendo analisada.

As aplicações práticas da ocorrência de reatividade cruzada entre tripanossomatídeos são claras. Vários estudos empregando antígenos de *T. cruzi*, tais como proteínas purificadas de parasitas lisados (MENDES et al., 1997), antígenos recombinantes (KRIEGER et al., 1992; DA SILVEIRA et al., 2001; Umezawa et al., 2003) e propostas para utilizar antígenos de tripanossomatídeos não patogênicos (LOPES et al., 1981; MONTEÓN et

al., 1997) são frequentemente sugeridos como alternativas para melhorar o diagnóstico sorológico da doença de Chagas. A detecção de anticorpos para *T. cruzi* tem sido o principal método diagnóstico para a doença de Chagas. Contudo, a maioria dos testes disponíveis emprega antígenos de formas epimastigotas que mostram um elevado número de resultados inconclusivos e falso-positivos, traduzindo um alto custo econômico e social.

Dois antígenos recombinantes: antígeno citoplasmático repetitivo (CRA) e o antígeno flagelar repetitivo (FRA), foram avaliados para teste diagnóstico na doença de Chagas. Os melhores resultados ocorreram quando os dois antígenos recombinantes foram usados juntos (CRA+FRA) e não isoladamente (KRIEGER et al., 1992). Um kit diagnóstico EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos (EIE-Rec) utilizando os antígenos CRA e FRA foi desenvolvido pela Fundação Oswaldo Cruz, para diagnóstico sorológico na fase crônica doença de Chagas, mostrando resultados satisfatórios (GOMES et al., 2001). Silva e colaboradores (2002) também utilizaram o kit EIE-Rec para monitorar a cura de pacientes chagásicos quando tratados ainda na fase aguda da doença, o qual discriminou precisamente os soros de pacientes tratados e curados dos soros de pacientes tratados e não curados com reações negativas e positivas, respectivamente.

Mais recentemente, Pereira e colaboradores (2005) mostraram a característica imunogênica e o efeito protetor dos antígenos CRA e FRA na fase aguda da doença de Chagas, em imunizações e subsequente desafio com *T. cruzi*. Ambos antígenos desencadearam uma resposta humoral e celular, com aumento da sobrevivência dos animais imunizados quando comparados ao controle.

Concluindo, no diagnóstico sorológico da doença de Chagas não há consenso sobre um antígeno ou uma mistura de proteínas recombinantes que precisamente discrimine soros de pacientes chagásicos dos não chagásicos, por razões óbvias de que nenhum teste diagnóstico está livre de limitações, uma vez que diferentes níveis de reações cruzadas podem ocorrer com epítomos presentes em outros microrganismos (GONÇALVES et al., 2002). Neste contexto, a procura de antígenos de *P. serpens* que contenham satisfatórios motivos que aumentem a especificidade e sensibilidade nos testes sorológicos podendo ser reconhecidos por anticorpos humanos, aliado ao fato de fácil cultivo e nenhum risco de contaminação, mostra-se como um interessante e valioso modelo para a busca de moléculas alternativas para o diagnóstico da doença de Chagas, bem como a descoberta e utilização de novas estratégias de imunização.

1.6 PROTEÔMICA

O termo “proteômica” foi inicialmente definido como caracterização em larga escala de proteínas de uma célula, tecido, ou de um organismo. Hoje, em uma definição mais precisa, entende-se como proteômica, um sistemático estudo de muitas e diversas propriedades das proteínas, as quais constituem um sistema dinâmico e integrado da biologia de uma célula ou de um organismo (GRAVES; HAYSTEAD, 2002; PATTERSON; AEBERSOLD, 2003).

A proteômica possibilitou visualizar o mapa protéico de um organismo, considerando uma série de eventos seqüenciais (Figura 16), que termina com a formação de uma proteína em particular. O mRNA pode ser alvo de modificações pós-transcricionais como *cis* e *trans-splicing*, poliadenilação, *capping*, edição de RNA. Além disso, modificações pós-traducionais, tais como proteólise e compartimentalização, podem regular a síntese de uma proteína. O fato é que somente com o estudo das proteínas, as modificações podem ser identificadas e caracterizadas.

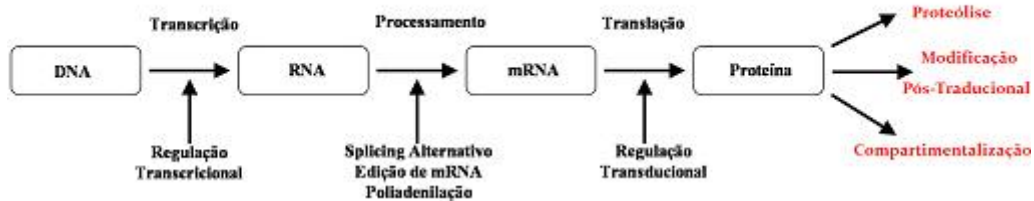


Figura 16 – Mecanismos de regulação gênica, resultando em múltiplos produtos. Múltiplas isoformas de proteínas podem ser sintetizadas após diversos mecanismos de processamento do RNA e modificações pós traducionais.

Fonte: Graves e Haystead (2002), modificado.

A caracterização do proteoma, de uma célula ou organismo, envolve algumas etapas como as descritas a seguir: a separação e isolamento das proteínas a serem analisadas; a aquisição da informação estrutural das proteínas e, finalmente, a utilização de um banco de dados para a definição e estruturação dos resultados obtidos (GRAVES; HAYSTEAD, 2002).

A primeira etapa de separação e isolamento das proteínas, predominantemente emprega a eletroforese em gel de poliacrilamida, com uma (1D) ou duas dimensões (2D), dependendo da amostra a ser analisada. Em sistemas que empregam uma

dimensão, as proteínas são separadas somente por sua massa molecular, o que pode ser um considerável problema quando se tem um lisado total de um organismo. Nesta situação, o sistema 2D fornece um resultado qualitativamente mais satisfatório, uma vez que as proteínas são separadas por duas propriedades distintas: o ponto isoelétrico na primeira dimensão e, a massa molecular na segunda dimensão.

Em um segundo momento, a informação estrutural das proteínas analisadas pode ser obtida através do sequenciamento de aminoácidos pela metodologia de Edman (EDMAN, 1949) ou por espectrometria de massa (MS). Na análise por MS, a massa do peptídeo e/ou a sequência de aminoácidos podem ser obtidos e, conseqüentemente, a identificação da proteína.

A análise por MS mede a razão da massa e carga (m/z) de íons gasosos (LANE, 2005) e requer inicialmente o preparo da amostra, que consiste na digestão das proteínas, seguido geralmente por purificação, para remoção de contaminantes. Uma segunda etapa envolve a ionização da amostra por *electrospray* (ESI) (FENN et al., 1989) ou por ionização/dessorção de matriz assistida por laser (MALDI) (KARAS; HILLENKAMP, 1988), sendo que em ambos métodos, os peptídeos são convertidos a íons, por ganho ou perda de um ou mais prótons. Finalmente, os íons moleculares podem então ser resolvidos, com base na massa e carga por analisadores acoplados a diferentes espectrômetros de massa.

1.6.1 Espectrômetros de massa

Os espectrômetros de massa (figura 17) normalmente contem um dispositivo de entrada, para introduzir o analito dentro da origem de ionização, a qual por sua vez ioniza as amostras; um ou mais analisadores de massa, para separar os íons de acordo com a razão m/z ; um espelho; um detector, com a finalidade de registrar o número de íons que saem do último analisador; e um computador, para o processamento dos dados obtidos e produção de um espectro de massa em uma forma acessível (GRAVES; HAYSTEAD, 2002; LANE, 2005). O nome dos diversos espectrômetros são dados de acordo com o método de ionização utilizado e o tipo de analisador de massa. A espectrometria de massa pode fornecer informação sobre a massa do peptídeo e, ou realizar o sequenciamento de aminoácidos. Na análise da massa do peptídeo ou *peptide mass fingerprinting*, a massa de peptídeos individuais é medida e usada para gerar um espectro de massa (HENZEL et al., 1993). No sequenciamento de aminoácidos

chamado de espectrometria de massa em tandem ou MS/MS, um peptídeo em particular é seletivamente fragmentado e resolvido em relação a sua carga/massa gerando uma série de peptídeos que diferem na massa por um único aminoácido, assim a sequência de aminoácidos pode ser deduzida.

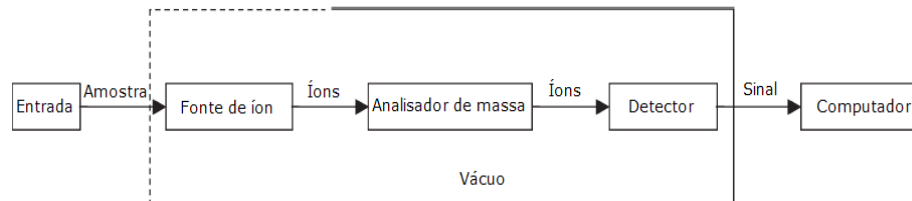


Figura 17 – Diagrama básico de um espectrômetro de massa.

Fonte: Lane (2005).

1.6.1.1 Ionização da amostra

Na tecnologia ESI (Figura 18), um fluxo de amostra líquida passa por um tubo microcapilar, no qual uma alta voltagem é aplicada. A solução percorre um campo elétrico entre o tubo microcapilar e um eletrodo de contagem. Ocorre então a formação de um vapor de pequenas gotas com cargas positivas. Estas micro - gotas direcionam-se ao eletrodo de contagem passando por um aquecimento (em torno de 180-270⁰C) ou uma cortina de nitrogênio aquecida para permitir a evaporação do solvente. Neste processo, as micro gotas evaporam-se rapidamente até que ocorre um aumento na densidade das cargas elétricas na superfície das gotas e uma redução no seu tamanho, provocando uma liberação dessas diminutas gotas. Este processo repete-se algumas vezes até que a amostra (analito) ionizada escapa da micro gota (GRAVES; HAYSTEAD, 2002; LANE, 2005; CAÑAS et al., 2006).

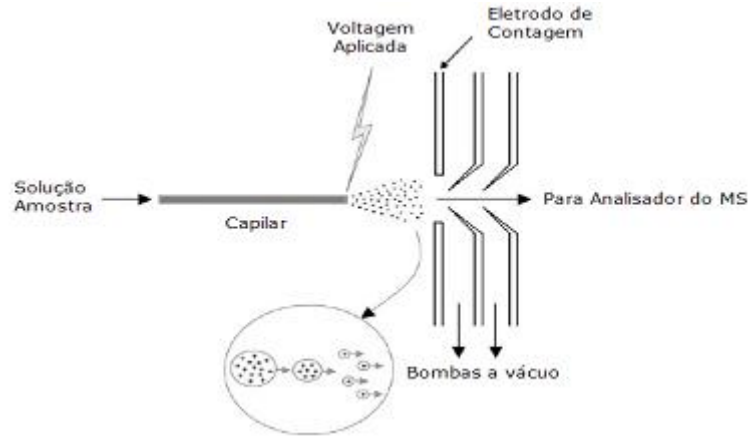


Figura 18 – Diagrama esquemático de um ESI e do processo ESI.

Fonte: Lane (2005).

Uma complicação da ESI é a purificação dos peptídeos após digestão no gel, pois essa manipulação é demorada e pode resultar em contaminação da amostra, além do tempo empregado na liberação manual dos tubos com a amostra. Para evitar esses problemas, o sistema ESI tem sido conectado a cromatografia líquida (LC), que automaticamente purifica e libera a amostra para o espectrômetro de massa. A tecnologia ESI obteve um significativo melhoramento com a implantação do *nanospray ionization* (NI); por uma diminuição do tubo microcapilar (1a $2\mu\text{m}$) reduziu também a quantidade da amostra consumida e aumentou o tempo disponível para a análise; 1-2 μL de amostra pode ser suficiente por horas, tornando possível a aquisição de dezenas de espectros (GRAVES; HAYSTEAD, 2002; CAÑAS et al., 2006).

Na tecnologia MALDI (Figura 19), a amostra é colocada ao longo de uma matriz, pequena molécula com a função de absorver energia semelhante ao ácido 2,5-dihidroxibenzóico ou ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico. A matriz e a amostra são misturadas em uma placa metálica a um solvente apropriado, o qual é submetido a evaporação, resultando na formação de cristais. A placa é colocada no espectrômetro de massa e um feixe de laser alternado que é tipicamente um laser nitrogênio, a 337nm é usado para excitar a matriz, causando um rápido aquecimento térmico das moléculas as quais são parcialmente vaporizadas, carregando moléculas do analito para dentro da fase de gás. Pouca energia interna é transferida para moléculas do analito, permitindo a ionização sem ocorrer a fragmentação das moléculas. Durante este processo, prótons são transferidos entre moléculas do analito e da

matriz, resultando na formação de moléculas do analito marcadas positivamente e negativamente. O laser promove assim, a formação de íons moleculares (GRAVES; HAYSTEAD, 2002; LANE, 2005; GUERRERA; KLEINER, 2005; CAÑAS et al., 2006).

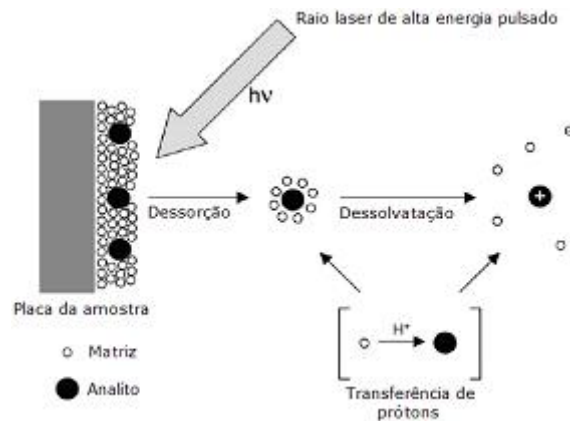


Figura 19 - O processo MALDI.

Fonte: Lane (2005).

O MALDI oferece algumas vantagens sobre ESI; a aplicação da amostra, bem como a coleção de dados e análise dos resultados, podem ser completamente automatizados. Somado a isto, a amostra pode geralmente ser usada sem nenhum tipo de purificação após o processo de digestão no gel (GRAVES; HAYSTEAD, 2002).

1.6.1.2 Analisadores de massa

Após a conversão das proteínas ou peptídeos a íons moleculares é realizada a análise da massa em analisadores acoplados aos espectrômetros de massa. Assim, campos elétricos e/ou magnéticos são usados para separar e detectar íons na fase de gás, resolvendo-os na base de sua carga e massa. Os espectrômetros de massa podem ser construídos com um ou mais analisadores, sendo que os instrumentos compostos por dois ou mais analisadores acoplados são designados de espectrômetros de massa em tandem ou MS/MS. A seguir é descrito dois tipos básicos de analisadores de massa frequentemente em uso na proteômica.

1.6.1.2.1 Quadrupolo

Um dos mais comuns analisadores de massa é o quadrupolo e consiste de quatro astes/ barras paralelas igualmente espaçadas em torno de um eixo central. Os íons são separados devido ao campo elétrico criado pelas barras. Barras opostas são eletricamente conectadas e duas voltagens são aplicadas (dois componentes): uma dc (corrente direta) e uma ac (corrente alternada) ou rf (frequência de rádio), sendo um conjunto com potencial positivo e o outro conjunto com potencial negativo. Os íons são introduzidos em um feixe contínuo percorrendo o eixo central entre os pólos (Figura 20) e são filtrados de acordo com a razão de sua carga e massa (m/z). O processo acontece da seguinte forma: os íons que passam entre as duas barras positivas que estão acima da razão m/z são transmitidos através do centro do quadrupolo, gerando uma elevada passagem de massa filtrada; os íons que passam entre as duas barras com potencial negativo e que estão abaixo da razão m/z são também transmitidos através do centro do quadrupolo, gerando uma baixa passagem de massa filtrada (GRAVES; HAYSTEAD, 2002; LANE, 2005; CAÑAS *et al.*, 2006).

Dentro de um quadrupolo esta combinação dos grupos negativos e positivos das barras permite que ocorra a sobreposição das duas regiões de massa filtrada, criando uma “tira de passagem” com uma área de estabilidade mútua e permitindo a passagem de íons com uma certa razão m/z , enquanto que íons com razão m/z fora desta área de estabilidade mútua não podem passar e correm para dentro das barras. A trajetória desses íons no interior deste campo oscilando eletricamente é complexa e somente os que apresentem trajetórias estáveis podem trafegar ao longo do quadrupolo e alcançarem o detector. A razão m/z dos íons que passam através do quadrupolo é proporcional à voltagem aplicada nas barras, ou seja, o aumento da voltagem aumenta consequentemente os valores da razão m/z dos íons que podem ser transmitidos pelo quadrupolo (GRAVES; HAYSTEAD, 2002; LANE, 2005; CAÑAS *et al.*, 2006).

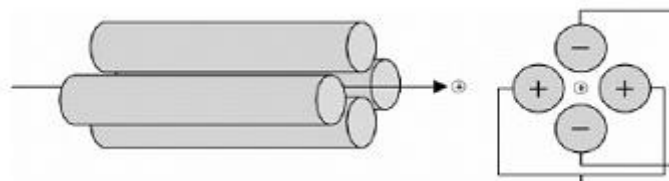


Figura 20 – Diagrama esquemático de um quadrupolo, mostrando a direção da trajetória do íon.

Fonte: Lane (2005), modificado.

1.6.1.2.2 Tempo de voo (TOF)

Um dos mais simples analisadores de massa é o TOF e baseia-se essencialmente em medir a razão m/z de um íon através da determinação do tempo necessário para que este íon percorra todo o comprimento do “flight tube” em alto vácuo. Os íons aceleram com energias iguais, percorrendo (“voando”) o tubo com diferentes velocidades, as quais são inversamente proporcionais as suas massas. Alguns analisadores de massa do tipo TOF são contituídos por um espelho ou refletor no final do tubo, que tem por finalidade refletir os íons para trás do “flight tube” direcionando para um detector, o que proporciona um aumento no comprimento do tubo, ao mesmo tempo, que corrige pequenas diferenças entre os íons. Um esquema de um analisador de massa TOF é mostrado abaixo (Figura 21).

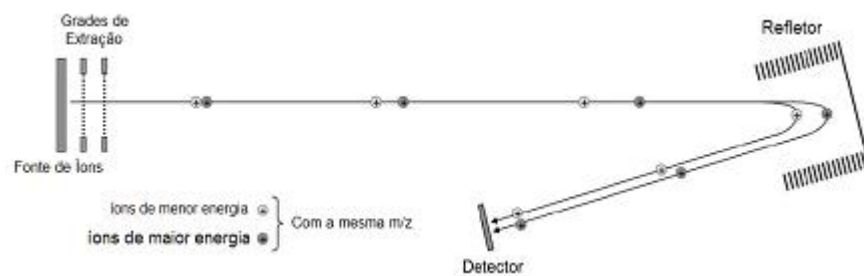


Figura 21 – Componentes básicos de um analisador de massa do tipo TOF.

Fonte: Lane (2005).

1.6.2 Proteômica de tripanossomatídeos

A utilização dos benefícios da proteômica tem se estendido a diversas áreas e para os mais variados objetivos. No estudo dos tripanossomatídeos a proteômica apresenta-se como uma ferramenta efetiva para elucidar uma série de mudanças adaptativas nesses parasitas (FAKHRY et al., 2002; ATWOOD et al., 2005). A análise proteômica de *T. cruzi* realizado por Parodi-Talice e colaboradores (2004) identificou grupos de proteínas envolvidas no metabolismo celular, reunião do citoesqueleto, liberação de proteínas, ciclo celular e síntese protéica de *T. cruzi*, que além de funcionalmente diferentes são expressas em

compartimentos subcelulares distintos, mostrando mais uma aplicação da proteômica em localizar intracelularmente um grupo de proteínas.

Paba e colaboradores (2004) realizaram uma análise comparativa do proteoma de *T. cruzi* envolvendo os estágios morfológicos do ciclo celular desse parasita. A análise comparativa do gel 2D das três formas de desenvolvimento mostrou que a maioria das proteínas estava presente em amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas, mostrando um padrão conservado de expressão. Os resultados sugerem que as características diferenciais entre os estágios morfológicos do parasita poderiam ser resultado de expressão diferencial de um número limitado de proteínas.

A diferenciação morfológica de *T. cruzi* no vetor ou no mamífero exibe mudanças no padrão de expressão de proteínas. Várias evidências indicam que a expressão de genes estágio específicos precede as alterações morfológicas ocorridas durante a metaciclogênese de *T. cruzi*. Análises do padrão de polipeptídeos mostram que as principais modificações nos produtos da expressão gênica parecem ocorrer nas primeiras 24 horas do processo de diferenciação *in vitro*. Após 12 horas de incubação no meio de diferenciação, epimastigotas começavam a expressar antígenos específicos de tripomastigotas (CONTRERAS et al., 1985). Resultados similares foram descritos na diferenciação das formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* (BENTE et al., 2003).

Algumas proteínas sintetizadas podem ser estágio-específicas e, conseqüentemente exercer um papel essencial na infectividade e sobrevivência do parasita. Neste contexto, a proteômica mostra-se eficaz na identificação dessas proteínas diferencialmente expressas, um passo inicial, porém indispensável na seleção de alvos quimioterápicos; identificação de fatores de virulência e resistência a drogas (BARRETT et al., 2003; URBINA; DOCAMPO; 2003; PARODI-TALICE et al., 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

▶ Identificar proteínas de *P. serpens* que reagem com soro de pacientes chagásicos através de ensaios de proteômica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Separar proteínas de *P. serpens* por eletroforese bi-dimensional.
- ▶ Selecionar proteínas de *P. serpens* que reagem com soro de pacientes chagásicos por reações de *Western blotting*.
- ▶ Identificar por espectrometria de massa proteínas de *P. serpens* selecionadas no gel 2D.
- ▶ Analisar a presença de antígenos comuns entre *P. serpens* e *T. cruzi* por ensaios de linfoproliferação a partir da imunização prévia de camundongos BALB/c com *P. serpens* e induzidos *in vitro* com antígenos de *T. cruzi* (Apêndice A).
- ▶ Avaliar a atividade tripanocida do extrato etanólico de *Erythrina speciosa* (Et-Es) em formas epimastigotas de cultura de *T. cruzi*.
- ▶ Determinar os parâmetros hematológicos (hemoglobina, hematócrito, eritrócitos e leucócitos) em camundongos Swiss infectados ou não com *T. cruzi* e tratados ou não com Et-Es.
- ▶ Avaliar a produção de nitrito por macrófagos obtidos de camundongos Swiss normais e infectados com *T. cruzi*, tratados ou não com Et-Es.
- ▶ Avaliar o curso da infecção chagásica experimental (determinação da taxa parasitária e sobrevivência) após administração oral e intraperitoneal de Et-Es em camundongos Swiss.
- ▶ Avaliar a atividade de Et-Es em formas promastigotas de *P. serpens* (Apêndice B).

REFERÊNCIAS

- ABREU-FILHO, B.A., DIAS FILHO, B.P., VERMELHO, A.B., JANKEVÍCIUS, S.I., JANKEVÍCIUS, J.V., DOS SANTOS, R.L. (2001) Surface component characterization as taxonomic tools for *Phytomonas* spp identification. *Parasitol Res.* 87: 138-144.
- ABE, F., NAGAFUJY, S., YAMAGUCHI, T., OKABE, H., MAKI, J., HIGO, H., AKAHANE, H., AGUILAR, A., JIMÉNEZ-ESTRADA, M., REYES-CHILPA, R. (2002) Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biol Pharm Bull.* 25(9):1188-1191.
- ABE, F., NAGAFUJI, S., OKAWA, M., KINJO, J., AKAHANE, H., OGURA, T., MARTINEZ-ALFARO, M.A., REYES-CHILPA, R. (2005) Trypanocidal constituents in plants 5.¹⁾ Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in the seeds of *Persea americana*. *Biol Pharm Bull.* 28(7): 1314-1317.
- ABRAHAMSOHN, I.A., COFFMAN, R.L. (1995) Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 155(8):3955-3963.
- ALMEIDA, M.L., CAVAZZANA, Jr. M., SANTOS, M.A., ITOW-JANKEVÍCIUS, S., JANKEVÍCIUS, J.V., ATTIAS, M., DE SOUZA, W. (1990) Isolation, axenic cultivation and ultrastructural characterization of *Phytomonas* sp in urucum (*Bixa orellana*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 85, suppl. I, p.135.
- ALMEIDA, F.V., BRANQUINHA, M. H., GIOVANE-DE-SIMONE, S., VERMELHO, A.B. (2003) Extracellular metalloproteinase activity in *Phytomonas françai*. *Parasitol Res.* 89(4):320-322.
- AHOMADEGBE, J.C., DOLLET, M., COULAUD, D., GARGANI, D., RIOU, G. (1990) Kinetoplast DNA permits characterization of pathogenic plant trypanosomes of economic importance. *Biol Cell.* 70:167-176.
- AYMERICH, S.; GOLDENBERG, S. (1989) The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm28c: comparison with other *T. cruzi* strains and trypanosomatids. *Exp. Parasitol.* 69:107-115.
- ATWOOD, III J. A.; WEATHERLY, D. B; MINNING, T. A.; BUNDY, B.; CAVOLA, C.; OPPERDOES, F. R.; ORLANDO, R.; TARLETON, R. L; (2005) The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science.* 39: 473-476.

BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J. S.; AUGUST STICH; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. (2003) The trypanosomiasis. *The Lancet*. 362:1469-1480.

BATISTOTI, M.; CAVAZZANA, M. Jr.; SERRANO, M. G.; OGATTA, S. F.; BACCAN, G. C.; JANKEVÍCIUS, J. V.; TEIXEIRA, M. M. G.; JANKEVÍCIUS, S. I. (2001) Genetic variability of trypanosomatids isolated from phytophagous hemiptera defined by morphological, biochemical, and molecular taxonomic markers. *J Parasitol*. 87(6):1335-1341.

BENTE, M.; HARDER, S.; WIESGIGL, M.; HEUKESHOVEN, J.; GELHAUS C.; KRAUSE E.; CLOS J.; BRUCHHAUS I. (2003) Developmentally induced changes of proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* 3:1811-1829.

BENZ, C., NILSSON, D., ANDERSSON, B., CLAYTON, C., GUILBIDE, D. L. (2005) Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 143: 125-134.

BERBEROF, M., VANHAME, L, PAYS, E. (1995) *Trypanosoma brucei*: a preferential splicing at the inverted polyadenylation site of the VSG mRNA provides further evidence for coupling between trans-splicing and polyadenylation. *Exp Parasitol*. 80:563:567.

BERRIMAN, M.; GHEDIN, E.; HERTZ-FOWLER, C.; BLANDIN, G.; RENAULD, H.; BARTHOLOMEU, D. C.; LENNARD, N. J.; CALER, E.; HAMLIM, N. E.; HAAS, B.; BOHME, U.; HANNICK, L.; ASLETT, M. A.; SHALLOM, J.; MARCELLO, L.; HOU, L.; WICKSTEAD, B.; ALSMARK, U. C.; ARROWSMITH, C.; ATKIN, R. J.; BARRON, A. J.; BRINGAUD, F.; BROOKS, K.; CARRINGTON, M.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, T. J.; CHURCHER, C.; CLARK, L. N.; CORTON, C. H.; CRONIN, A.; DAVIES, R. M.; DOGGET, J.; DJIKENG, A.; FELDBLYUM, T.; FIELD, M. C.; FRASER, A.; GOODHEAD, I.; HANCE, Z.; HARPER, D.; HARRIS, B. R.; HAUSER, H.; HOSTETLER, J.; IVENS, A.; JAGELS, K.; JOHNSON, D.; JOHNSON, J.; JONES, K.; KERHORNOU, A. X.; KOO, H.; LARKE, N.; LANDFEAR, S.; LARKIN, C.; LEECH, V.; LINE, A.; LORD, A.; MACLEOD, A.; MOONEY, P. J.; MOULE, S.; MARTIN, D. M.; MORGAN, G. W.; MUNGALL, K.; NORBERTCZAK, H.; ORMOND, D.; PAI, G.; PEACOCK, C. S.; PETERSON, J.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M. A.; REITTER, C.; SALZBERG, S. L.; SANDERS, M.; SCHOBEL, S.; SHARP, S.; SIMMONDS, M.; SIMPSON, A. J.; TALLON, L.; TURNER, C. M.; TAIT, A.; TIVEY, A. R.; VAN AKEN, S.; WALKER, D.; WANLESS, D.; WANG, S.; WHITE, B.; WHITE, O.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J.; WORTMAN, J.; ADAMS, M. D.; EMBLEY, T. M.; GULL, K.; ULLU, E.; BARRY, J. D.; FAIRLAMB, A. H.; OPPERDOES, F.; BARRELL, B. G.; DONELSON, J. E.; HALL, N.; FRASER, C. M.; MELVILLE, S. E.; EL-SAYED, N. M. (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*. 309(5733):416-422.

BERGER, I.; BARRIENTOS, A. C.; CÁCERES, A.; HERNÁNDEZ, M.; RASTRELLI, L.; PASSREITER, C.M.; KUBELKA, W. (1998) Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections I I. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. J Ethnopharmacol. 62:107-115.

BIEBINGER, S.; CLAYTON, C. (1996) A plasmid shuttle vector bearing an rRNA promoter is extrachromosomally maintained in *Crithidia fasciculata*. Exp Parasitol. 83(2):252-258.

BISAGGIO, D. F. R.; CAMPANATI, L.; PINTO, R. C. V.; SOUTO-PADRÓN, T. (2006) Effect of suramin on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: changes on cell motility and the ultrastructure of the flagellum-cell body attachment region. Acta Trop. 98(2):162-175.

BREGANÓ, J. W.; PICÃO, R. C.; GRAÇA, V. K.; MENOLLI, R. A.; ITOW-JANKEVÍCIUS, S.; PINGE-FILHO, P.; JANKEVÍCIUS, J. V. (2003) *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. 39: 257-264.

BRENER, Z. & CHIARI, E. (1967) Suscetibilidade de diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi* a vários agentes quimioterápicos. Rev Inst Med Trop S Paulo. 9:197-207.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T.; (1997) Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. Int Arch Allergy Immunol. 114(2):103-110.

CAMARGO, E. P. (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypansomes in liquid media. Rev Inst Med Trop S Paulo. 6:93-100.

CAMARGO, E. P.; SILVA, S.; ROITMAN, I.; DE SOUZA, W.; JANKEVÍCIUS, J. V.; DOLLET, M. (1987) Enzymes of ornithine-arginine metabolism in trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. J Protozool. 34:439-441.

CAMARGO, E. P.; SBRAVATE, C.; TEIXEIRA, M. M. G.; ULIANA, S. R. B.; SOARES, M. B. M.; AFFONSO, H. T.; FLOETER-WINTER, L. M. (1992) Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids. J Parasitol. 78(1):40-48.

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

CAÑAS, B.; LÓPEZ-FERRER, D.; RAMOS-FERNÁNDEZ, A.; CAMAFEITA, E.; CALVO, E. (2006) Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 4(4):295-320.

CARRARA, F. E.; ITOW-JANKEVÍCIUS, S.; CAVAZZANA, J. R. M.; CATARINO, L. M. G. M.; UENO, C. T.; JANKEVÍCIUS, J. V.; KANESHIMA, E. N.; TAKIHATA, J. T. (1992) Detection and “in vitro” cultivation of flagellate protozoa found in orange (*Citrus aurantium* cultivar pera) and in grape (*Vitis vinifera*). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 87, suppl.II, p. 241.

CATARINO, L. M. G. M.; CAVAZZANA, Jr. M.; SANTOS, M. A.; UENO, C. T.; ITOW-JANKEVÍCIUS, S.; JANKEVÍCIUS, J. V.; ATTÍAS, M.; DE SOUZA, W. (1991) Axenic cultivation and ultrastructure of *Phytomonas* sp from pomegranate (*Punica* sp) and from phytophagous hemipteran *Leptoglossus* sp. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 86, suppl I, p.271.

CATARINO, L. M.; SERRANO, M.G.; CAVAZZANA, Jr. M.; ALMEIDA, M. L.; KANESHIMA, E. K.; CAMPANER, M.; JANKEVÍCIUS, J. V.; TEIXEIRA, M. M. G.; ITOW-JANKEVÍCIUS S. (2001) Classification of trypanosomatids from fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 201:65-72.

CAVAZZANA, Jr. M.; ALMEIDA, M. L.; GARCIA, J. F.; CATARINO, L. M. G. M.; ONO, C. J.; JANKEVÍCIUS, J. V.; ITOW, JANKEVÍCIUS S. (1993) Isolation and cultivation of trypanosomatid from mulberry (*Morus* sp) and “guandu” beans (*Cajannus flavus*). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 88, suppl I, p. 282.

CAVAZZANA, Jr. M.; BACCAN, G. C.; CAMILO, S. B.; TAGATA, E.; JANKEVICIUS, J. V.; ITOW –JANKEVICIUS, S. (1995) Isolation and in vitro cultivation of trypanosomatids found in apple (*Malus* sp). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 90, suppl. I, 246.

CAVAZZANA, Jr. M.; UENO, C. T.; KANESHIMA, E. N.; DOMENE, G. T.; JANKEVÍCIUS, J. V.; ITOW-JANKEVÍCIUS, S. (1996) Detection and isolation of protozoa in pitanga fruit (*Eugenia* sp). *Mem Inst Oswaldo Cruz.*91, suppl., November.

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

CAZZULO, J. J. (2002) Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Top Med Chem.* 2(11):1261-1271.

CHAGAS, C. (1909) Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homen. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1:159-218.

CHAUMONT, F.; SCHANCK, N. A.; BLUM, J. J.; OPPERDOES, F. R. (1994) Aerobic and anaerobic glucose metabolism of *Phytomonas* sp. Isolated from *Euphorbia characias*. Mol Biochem Parasitol.67:321-331.

CLAYTON, C. E.; MICHELS, P. (1996) Metabolic compartmentation in African trypanosomes. Parasitol Today. 12:465-471.

CONCHON, I.; CAMPANER, M.; SBRAVATE, C.; CAMARGO, E. P. (1989) Trypanosomatids, other than *Phytomonas* spp., isolated and cultured from fruit. J Protozool. 36(4):412-414.

CONTRERAS, V. T.; MOREL, C.; GOLDENBERG, S. (1985) Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Mol Biochem Parasitol. 14:83-96.

CULLY, D. F.; IP, H. S.; RIBBE, J. (1985) Coordinate transcription of variant surface glycoprotein genes and an expression site associated gene family in *Trypanosoma brucei*. Cell.1:173-182.

DANTAS, A. P.; OLIVIERI, B. P.; GOMES, F. H. M.; CASTRO, S. L. (2006) Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with própolis promotes changes in the immune response. J Ethnopharmacol. 103:187-193.

DA SILVA, A. P. G.; ABRAHAMSOHN, I. A. (2001) Interleukin-12 stimulation of lymphoproliferative responses in *Trypanosoma cruzi* infection. Mol Biochem Parasitol.104:349-354.

DA SILVEIRA, J. F.; UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A. O. (2001) Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. Trends Parasitol. 17(6):286-291.

D'AVILA-LEVY, C. M.; SANTOS, O. L.; MARINHO, F. A.; DIAS, F. A.; LOPES, A.H.; SANTOS, A. L. S.; BRANQUINHA, M. H. (2006) Gp-63-like molecules in *Phytomonas serpens*: possible role in the insect interaction. Curr Microbiol. 52(6):439-444.

DE SOUZA, W.; MOTTA, M. C. M. (1999) Endosymbiosis in protozoa of Trypanosomatidae family. FEMS Microbiol Lett. 173:1-8.

DOCAMPO, R. (1990) Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. Chem Biol Interact. 73:1-27.

DOCAMPO, R. (2001) Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. Curr Pharm Des. 7(12):1157-1164.

DOLLET, M. ; LOPES, G. (1978) Étude sur l'association de protozoaires flagellés à la marchitez sorpressiva du palmier à huile en Amérique du Sud. Oléagineux. 33, 209-217.

DOLLET, M. (2001) Phloem-restricted trypanosomatids form a clearly characterised monophyletic group among trypanosomatids isolated from plants. Int J Parasitol. 31:459-467

DONOVAN, C. (1909) Kala-azar in Madras, especially with regard to its connexion with the dog and the bug (*Conorrhinus*). Lancet. 177:1495-1496.

DOS SANTOS, A.L.S.; ALVIANO, C.S.; SOARES, R. M.A. (2002) Detection of sialoglycomolecules in five plant trypanosomatids and in an insect phytophagous isolate. FEMS Microbiol Lett. 214(1):19-23.

DOS REIS, G. A. (1997) Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Parasitol Today. 13:335-342.

DOWNEY, N.; DONELSON, J. E. (1999) Expression of foreign proteins in *Trypanosoma congolense*. Mol Biochem Parasitol. 104(1): 39-53.

DREW, M. E.; ENGLUND, P. T. (2001) Intramitochondrial localization and dynamics of *Crithidia fasciculata* kinetoplast minicircle replication intermediates. J Cell Biol. 153:735-744.

DVORAK, J. A.; HALL, T. E.; CRANE, M. S. T.; ENGEL, J. C.; McDANIEL, J. P.; URIEGAS, R. (1982) *Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. J Protozool. 29(3):430-437.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BLANDIN, G.; BERRIMAN, M.; CRABTREE, J.; AGGARWAL, G.; CALER, E.; RENAULD, H.; WORTHEY, E. A.; HERTZ-FOWLER, C.; GHEDIN, E.; PEACOCK, C.; BARTHOLOMEU, D. C.; HAAS, B. J.; TRAN, A. N.; WORTMAN, J. R.; ALSMARK, U. C.; ANGIUOLI, S.; ANUPAMA, A.; BADGER, J.; BRINGAUD, F.; CADAG, E.; CARLTON, J. M.; CERQUEIRA, G. C.; CREASY, T.; DELCHER, A. L.; DJIKENG, A.; EMBLEY, T. M.; HAUSER, C.; VENS, A. C.; KUMMERFELD, S. K.; PEREIRA-LEAL, J. B.; NILSSON, D.; PETERSON, J.; SALZBERG, S. L.; SHALLOM, J.; SILVA, J. C.; SUNDARAM, J.; WESTENBERGER, S.; WHITE, O.; MELVILLE, S. E.; DONELSON, J. E.; ANDERSSON, B.; STUART, K. D.; HALL, N. (2005a) Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*.309(5733):404-409.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A. N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E. A.; DELCHER, A. L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S. J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G. C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D. A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; DA SILVEIRA, J. F.; DE JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P. T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A. C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M. J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C. R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J. C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J. L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, D. O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A. J.; SISK, E.; TAMMI, M. T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P. N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; STUART, K. D.; ANDERSSON, B. (2005b) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309(5733):409-415.

EDMAN, P. (1949) A method for the determination of the amino acid sequence of peptides. *Arch Biochem Biophys*. 22:475-783.

FAIRLAMB, A. H.; BOWMAN, I. B. R. (1980) Uptake of trypanocidal drug suramin by bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and its effects on respiration and growth rate in vivo. *Mol Biochem Parasitol*. 1:315-333.

FAIRLAMB, A. H.; CARTER, N. S.; CUNNINGHAM, M.; SMITH, K. (1992) Characterization of melarsen-resistant *Trypanosoma brucei brucei* with respect to cross-resistance to other drugs and trypanothione metabolism. *Mol Biochem Parasitol*. 53(1-2):213-222.

FAKHRY, Y. E.; OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. (2002) A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*. 2:1007-1017.

FERNÁNDEZ-BECERRA, C.; OSUNA, A.; MULLER, E.; DOLLET, M.; SANCHEZ-MORENO, M. (1996) Characterization of *Phytomonas* isolated from fruits by electrophoretic isoenzymes and Kinetoplast-DNA analysis. FEMS Microbiol Lett. 145:463-468.

FENN, J. B.; MANN, C. K.; MENG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science. 246:64-71.

FILARDI, L. S. & BRENER, Z. (1987) Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Trans R Soc Trop Med Hyg. 81:755-759.

FIORINI, J. E.; FIORINI, C. M.; DE PAULA, K. F.; PEDREIRA, R. C.; DE ALMEIDA, D. C.; BRAZIL, R. P. (1990) Cultivation of a *Phytomonas* isolated from orange (*Citrus aurantium* L. var. Lumia) and *Leptoglossus stigma* (Hemiptera, Coreidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 85, suppl., p. 134.

FIORINI, J. E.; FIORINI, C. M.; NASCIMENTO, L. C.; NASCIMENTO, J. A.; FARIA E SILVA, P. M. (1993) *Phytomonas* isolation from different plants in southeast Minas Gerais State, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 88, suppl., p.286.

FRASCH, A. C. C. (2000) Functional diversity in the trans-sialidase and micin families in *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Today. 16(7):282-286.

GARCIA, E. E AZAMBUJA, P. (1991). Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. Parasitol Today. 7: 240-244.

GAZZINELLI, R. T.; ROMANHA, A. J.; FONTES, G.; CHIARI, E.; GAZZINELLI, G.; BRENNER, Z. (1991) Distribution of carbohydrates recognized by lectins *Eunymus europeus* and concanavalin A in monoxenic and heteroxenic trypanosomatids. J Protozool. 38:320-325.

GILINGER, G.; BELLOFATTO, V. (2001) Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. Nucleic Acids Res. 29(7):1556-1564.

GOMES, Y. M.; PEREIRA, V. R.; NAKAZAWA, M.; ROSA, D. S.; BARROS, M. D.; FERREIRA, A. G.; SILVA, E. D.; OGATTA, S. F.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S. (2001) Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. Mem Inst Oswaldo Cruz. 96(4):497-501.

GONÇALVES, C. C. M.; REICHE, E. M. V.; ABREU, FILHO B. A.; SILVEIRA, T. G. V.; FELIZARDO, T. C.; MAIA, K. R.; COSTACURTA, R.; PADOVESI, E. J.; DIAS, FILHO B. P.; ITOW-JANKEVÍCIUS, S.; JANKEVÍCIUS, J. V. (2002) Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a western blot for diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 66:91-102.

GRAÇA, V. K, JANKEVÍCIUS, J. V. (2002) Avaliação da reatividade cruzada humoral e celular entre *Phytomonas serpens* e *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de mestrado em Microbiologia na Universidade Estadual de Londrina.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. (2002) Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev.*66:1: 39-63.

GUERRINI, F.; SÉGUR, C.; GARGANI, D.; TIBAYRENC, M.; DOLLET, M. (1992) An isoenzyme analysis of the genus *Phytomonas*: genetic, taxonomic and epidemiologic significance. *J Protozool.* 39:516-521.

GUERRERA, I. C.; KLEINER, O. (2005) Application of mass spectrometry in proteomics. *Biosci Rep.* 25(1/2): 71-93.

GUILBRIDE, D. L.; ENGLUND, P. T. (1998) The replication mechanism of kinetoplast DNA networks in several trypanosomatid species. *J Cell Sci.*111:675-679.

GULL, K. (2001) The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. *I J Parasitol.* 31:443-452.

HENZEL, W. J.; BILLECI, T. M.; STULTS, J. T.; WONG, S. C. (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in proteins sequence database. *Proc Natl Acad Sci* 90: 5011-5015.

HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; PETTERSSON, U. (1996) Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today.* 12(3):108-114.

HODO, H. G.; HATCHER, F. M. (1986) Multiple DNA-dependent RNA polymerases in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 19:77-81.

HOLETZ, F. B.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. V. P.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; TOLEDO, C. E. M.; NAKAMURA, C. V. (2005) Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpeessoai*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100(4): 397-401.

IGWEH, A. C.; AGUIYI, J. C.; OKWUASABA, F. K. (2002) Antitrypanosomal effect of the aqueous extract of *Brassica oleraceae*. *Fitoterapia*. 73: 17-21.

ITOW-JANKEVÍCIUS, S.; ALMEIDA, M. L.; JANKEVÍCIUS, J. C.; CAVAZZANA, M.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W. (1993) Axenic cultivation of trypanosomatids found in corn (*Zea mays*) and in phytophagous hemipterans (*Leptoglossus zonatus* –Coreidae) and their experimental transmission. *J Euk Microbiol*. 40(5):576-581.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; MURPHY, L.; AGGARWAL, G.; BERRIMAN, M.; SISK, E.; RAJANDREAM, M. A.; ADLEM, E.; AERT, R.; ANUPAMA, A.; APOSTOLOU, Z.; ATTIPOE, P.; BASON, N.; BAUSER, C.; BECK, A.; BEVERLEY, S. M.; BIANCHETTIN, G.; BORZYM, K.; BOTHE, G.; BRUSCHI, C. V.; COLLINS, M.; CADAG, E.; CIARLONI, L.; CLAYTON, C.; COULSON, R. M.; CRONIN, A.; CRUZ, A. K.; DAVIES, R. M.; DE GAUDENZI, J.; DOBSON, D. E.; DUESTERHOEFT, A.; FAZELINA, G.; FOSKER, N.; FRASCH, A. C.; FRASER, A.; FUCHS, M.; GABEL, C.; GOBLE, A.; GOFFEAU, A.; HARRIS, D.; HERTZ-FOWLER, C.; HILBERT, H.; HORN, D.; HUANG, Y.; KLAGES, S.; KNIGHTS, A.; KUBE, M.; LARKE, N.; LITVIN, L.; LORD, A.; LOUIE, T.; MARRA, M.; MASUY, D.; MATTHEWS, K.; MICHAELI, S.; MOTTRAM, J. C.; MULLER-AUER, S.; MUNDEN, H.; NELSON, S.; NORBERTCZAK, H.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; PENTONY, M.; POHL, T. M.; PRICE, C.; PURNELLE, B.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; REINHARDT, R.; RIEGER, M.; RINTA, J.; ROBBEN, J.; ROBERTSON, L.; RUIZ, J. C.; RUTTER, S.; SAUNDERS, D.; SCHAFER, M.; SCHEIN, J.; SCHWARTZ, D. C.; SEEGER, K.; SEYLER, A.; SHARP, S.; SHIN, H.; SIVAM, D.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TOSATO, V.; VOGT, C.; VOLCKAERT, G.; WAMBUTT, R.; WARREN, T.; WEDLER, H.; WOODWARD, J.; ZHOU, S.; ZIMMERMANN, W.; SMITH, D. F.; BLACKWELL, J. M.; STUART, K. D.; BARRELL, B.; MYLER, P. J. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 309(5733):436-442.

JANKEVÍCIUS, J. V.; ITOW-JANKEVÍCIUS, S.; CARMO, J. B.; CONCHON, I.; MAEDA, L. A.; CAMPANER, M.; CAMARGO, E. P.; ROITMAN, I. (1987) "In vitro" culture of *Phytomonas* of Solanaceae. In: Dollet, M. & Wallace, F.G. *Compte rendu du Premier Phytomonas Workshop – Cayenne*. Oleagineux. 42:461-468.

JANKEVÍCIUS, J. V.; ITOW-JANKEVÍCIUS, S.; CAMPANER, M.; CONCHON, I.; MAEDA, L.; TEIXEIRA, M. M. G.; FREYMULLER, E.; CAMARGO, E. P. (1989) The life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes. *J Protozool*. 36:265-271.

JANOVY, J. J.; LEE, K. W.; BRUMBAUGH, J. A. (1974) The differentiation of *Herpetomonas megaseliac*: ultrastructural observations. *J Protozool*. 1:53-59.

JENNINGS, F. W.; CHAUVIÈRE, G.; VIODÉ, C.; MURRAY, M. (1996) Topical chemotherapy for experimental African trypanosomiasis with cerebral involvement: the use of melarsoprol combined with the 5-nitroimidazole, megalzol. *Trop Med Int Health*. 1:363-366.

JOHNSON, P. J.; KOOTER, J. M.; BORST, P. (1987) Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell*. 51(2):273-281.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. (1988) Laser desorption /ionization of proteins with molecular mass exceeding 10,000daltons. *Anal Chem*. 60(20):2299-2301.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.; CROFT, S. (2003) Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol Res*. 90:S55-S62.

KITAJIMA, E. W.; VAISTEIN, M. H.; SILVEIRA, J. M. (1986) Flagellate protozoon associated with poor development of the root system of cassava in the Espírito Santo state, Brasil. *Phytopathol*. 76(6)638-642.

KLINGBEIL, M. M.; DREW, M. E.; LIU, Y. N.; MORRIS, J. C.; MOTIKA, S. A.; SAXOVSKY, T. T.; WANG, Z. F.; ENGLUND, P. T. (2001) Unlocking the secrets of trypanosomatids kinetoplast DNA network replication. *Protist*. 152:255-262.

KRAUSE, D. S.; DEUTSCH, C. (1991) Cyclic AMP directly inhibits IL-2 receptor expression in human T cells: expression of both p55 and p75 subunits is affected. *J Immunol*. 146(7):2285-2296.

KRIEGER, M. A.; ALMEIDA, E.; OELEMANN, W.; LAFILLE, J. J.; PEREIRA, K. B.; KRIEGER, H.; CARVALHO, M. R.; GOLDENBERG, S. (1992) Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg*. 46:427-434.

KUBATA, B. K.; KABUTUTU, Z.; NOZAKI, T.; MUNDAY, C. J.; FUKZUMI, S.; OHKUBO, K.; LAZARUS, M.; MARUYAMA, T.; MARTIN, S. K.; DUSZENKO, M.; URADE, Y. (2002) A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*. 196(9):1241-1251.

LAFONT, A. (1909) Sur la presence d'un parasite de la classe des flagelés dans le latex de l'*Euphorbia pilulifera*. *C R Soc Biol*. 66:1011-1013.

LAMMEL, E. M.; BARBIERI, M. A.; WILKOWSKY, S. E.; BERTINI, F.; ISOLA, E. L. (1996) *Trypanosoma cruzi*: involvement of intracellular calcium in multiplication and differentiation. *Exp Parasitol*. 83(2):240-249.

LANDFEAR, S. M.; IGNATUSHCHENKO, M. (2001) The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*. 115(1):1-17.

LANE, C. S. (2005) Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. *CMLS, Cell Mol Life Sci.* 62:848-869.

LEBOWITZ, J. H.; SMITH, H. Q.; RUSCHE, L.; BEVERLEY, S. M. (1993) Coupling of poly (A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Gene Develop.* 7:996-1007.

LIANG, X.; HARITAN, A.; ULIEL, S.; MICHAELI, S. (2003) trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell.* 2(5):830-840.

LI, S.; XIE, L.; ZHANG, C.; ZHANG, Y.; GU, M.; ZHANG, R. (2004) Cloning and expression of a pivotal calcium metabolism regulator: calmodulin involved in shell formation from pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 138(3):235-243.

LIRUSSI, D.; LIJ.; PRIETO, J. M.; GENNARI, M.; BUSCHIAZZO, H.; RÍOS, J. L.; ZAIDENBERG, A. (2004) Inhibition of *Trypanosoma cruzi* by plant extracts used in Chinese medicine. *Fitoterapia.* 75:718-723.

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

LUIZE, P. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V. (2006) Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck against *Trypanosoma cruzi*. *Biol Pharm Bull.* 29(10): 2126-2130.

LUKES, J.; HASHIMI, H.; ZIKOVÁ, A. (2005) Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr Genet.* 48:277-299.

MADISON-ANTENUCCI, S.; GRAMS, J.; HAJDUK, S. L. (2002) Editing machines: the complexities of trypanosome RNA editing. *Cell.* 108:435-438.

McGHEE, R. B.; COSGROVE, W. B. (1980) Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiol Rev.* 44(1):140-173.

MALDONADO, R. A.; LINS, J.; THOMAZ, N.; OLSON, C. L.; ENGMAN, D. M.; GOLDENBERG, S. (1997) Homologues of the 24-KDa flagellar Ca-binding protein gene of *Trypanosoma cruzi* are present in other members of the Trypanosomatidae family. *Exp parasitol.* 86:200-215.

MARCHÉ, S.; ROTH, C.; PHILIPPE, H.; DOLLET, M.; BALTZ, T. (1995) Characterization and detection of plant trypanosomatids by sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Mol Biochem Parasitol.* 71:15-26.

MARÍN, C.; HITOS, A. B.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, I.; DOLLET, M.; SÁNCHEZ-MORENO, M. (2004) *Phytomonas* iron superoxide dismutase: a possible molecular marker. *FEMS Microbiol Lett.* 234:69-74

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; LÓPEZ, I.; HERNÁNDEZ, R. (1997) pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *GENE.* 199(1-2):71-76.

MASLOV, D. A.; HOLLAR, L.; HAGHIGHAT, P.; NAWATHEAN, P. (1998) Demonstration of mRNA editing and localization of guide RNA genes in kinetoplast-mitochondria of the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Mol Biochem Parasitol.* 93(2):225-236.

MASLOV, D. A.; NAWATHEAN, P.; SCHEEL, J. (1999) Partial kinetoplast-mitochondrial gene organization and expression in the respiratory deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Mol Biochem Parasitol.* 99:207-221.

MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. (1994) A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Develop.* 8:491-501.

MAYA, J. D.; REPETTO, Y.; AGOSIN, M.; OJEDA, J. M.; TELLEZ, R.; GAULE, C.; MORELLO, A. (1997) Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 86(1):101-106.

MAYA, J. D.; BOLLO, S.; NUÑEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PÉRIÉ, J.; CHAUVIÈRE, G. (2003) *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurans derivatives. *Biochem Pharmacol.* 65: 999-1006.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VASQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAUNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. (2006) Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*

- MENARA, A.; DOLLET, M.; GARGANI, D.; LOUISE, C. (1988) Culture *in vitro* sur cellules d'invertébrés des *Phytomonas* spp.(Trypanosomatidae) associés au hartrot, maladie du cocotier. C R Soc Acad Sci. 307:597-602.
- MENDES, R. P.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; MOURA, D. A.; SILVA, A. M.; MOTA, I.; HEREDIA, R. A.; LUQUETTI, A. O.; LESER, P. G. (1997) Serological diagnosis of Chagas' disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. J Clin Microbiol. 35(7):1829-1834.
- MICHELIN, M. A.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. C. (2005) Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Exp Parasitol. 111:71-79.
- MINOPRIO, P. M.; EISEN, H.; FORNI, L.; D'IMPERIO LIMA, M. R.; JOSKOWICS, M.; COUTINHO, A. (1986a) Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. Scand J Immunol. 24(6):661-668.
- MINOPRIO, P. M.; COUTINHO, A.; JOSKOWICZ, M.; D'IMPERIO LIMA, M. R.; EISEN, H. (1986b) Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. Scand J Immunol. 24(6):669-679.
- MINOPRIO, P.; ITOHARA, S.; HEUSSER, C.; TONEGAWA, S.; COUTINHO, A. (1989a) Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. Immunol Ver. 112:183-207.
- MINOPRIO, P.; BANDEIRA, A.; PEREIRA, P.; MOTA, SANTOS, T.; COUTINHO, A. (1989b) Preferential expansion of Ly-1 B and CD4- CD8- T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. Int Immunol. 1(2):176-184.
- MOLINAS, S. M.; ALTABE, S. G.; OPPERDOES, F. R.; RIDER, M. H.; MICHELS, P. A. M.; UTTARO, A. D. (2003) The multifunctional isopropil alcohol dehydrogenase of *Phytomonas* sp. could be the result of a horizontal gene transfer from a bacterium to the trypanosomatid lineage. J Biol Chem. 278(38):36169-36175.
- MONTEÓN, V. M.; GUZMÁN-ROJAS, L.; NEGRETE-GARCÍA, C.; ROSALES-ENCINA, J. L.; LOPES, P. A. (1997) Serodiagnosis of American trypanosomiasis by using nonpathogenic trypanosomatid antigen. J Clin Microbiol. 35(12):3316-3319.
- MORRIS, J. C.; DREW, M. E.; KLINGBEIL, M. M.; MOTYKA, S. A.; SAXOWSKY, T. T.; WANG, Z.; ENGLUND, P. T. (2001) Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. Int J Parasitol. 31(5-6):453-458.

- MOSOLOV, V. V.; GRIGOR, EVA L. I.; VALUEVA, T. A. (2001) Involvement of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection. *Appl Biochem Parasitol.* 37:115-123.
- MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL, J. J.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A.; ESCARIO, J. Á.; MARTÍNEZ-FERNANDEZ, A. R.; GÓMEZ-BARRIO, A. (2000) *In vitro* screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *J Ethnopharmacol.* 71(1-2): 101-107.
- MULLER, E.; GARGANI, D.; SCHAEFFER, V.; STEVENS, J.; FERNÁNDEZ-BECERRA, C.; SANCHEZ-MORENO, M.; DOLLET, M. (1994) Variability in the phloem restricted plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) associated with wilts of cultivated crops. Isoenzyme comparison with the lower trypanosomatids. *Eur J Plant Pathol.* 100: 425-434.
- MURTA, S. M. F.; GAZZINELLI, R. T.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J. (1998) Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biol Parasitol.* 93: 203-214.
- MURTA, S. M. F.; KRIEGER, M. A.; MONTENEGRO, L. R.; CAMPOS, F. F. M.; PROBST, C. M.; ÁVILA, A. R.; MUTO, N. H.; OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R.; NIRDÉ, P.; BRUNA-ROMERO, O.; GOLDENBERG, S.; ROMANHA, A. J. (2006) Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol & Biochem Parasitol.* 146(2):151-162.
- NAKAMURA, C. V.; ESTEVES, M. J. G.; ANDRADE, A. F. B.; ALVIANO, C. S.; DE SOUZA, W.; ANGLUSTER, J. (1993) Chitin: a cell-surface component of *Phytomonas françai*. *Parasitol Res.* 79:523-526.
- NAWATHEAN, P.; MASLOV, D. A. (2000) The absence of genes for cytochrome c oxidase and reductase subunits in maxicircle kinetoplast DNA of the respiration-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Curr Genet.* 38:95-103.
- NOGUCHI, H. (1926) Comparative studies of *Herpetomonas* and *Leishmania*. Differentiation of the organisms by serological reactions and fermentation tests. *J Exp Med.* 44(3):327-337.
- NUNES, L. R.; TEIXEIRA, M. M. G.; CAMARGO, E. P.; BUCK, G. A. (1995) Sequence and structural characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Phytomonas*. *Mol Biochem Parasitol.* 74:233-237.

OGUETA, S. B.; SOLARI, A.; TELLEZ-INON, M. T. (1994) *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms possess a Ca (2+)-calmodulin dependent protein kinase. FEBS Lett. 337(3):293-297.

ORR, G. A.; TANOWITZ, H. B.; WITTNER, M. (1992) *Trypanosoma cruzi*: stage expression of calmodulin-binding proteins. Exp Parasitol. 74(2):127-133.

OTSU, K.; DONELSON, J. E.; KIRCHHOFF, L. V. (1993) Interruption of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a protein containing 14-amino acid repeats by targeted insertion of the neomycin phosphotransferase gene. Mol Biochem Parasitol. 57(2):317-330.

PABA, J.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R.; FONTES, W.; SOUZA, M. V.; RICART, C. A. (2004) Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. Proteomics. 4(4):1052-1059.

PACHECO, R. S.; MAZORCHI, M. C. A.; PIRES, M. Q.; BRITO, C. M. M.; MADEIRA, M. F.; BARBOSA-SANTOS, E. G. O. (1998) Parasite genotypically related to a monoxenous trypanosomatid of dog's flea causing opportunistic infection in an HIV positive patiente. Mem Inst Oswald Cruz. 93(4):531-537.

PALENCHAR, J. B.; BELLOFATTO, V. (2006) Gene transcription in trypanosomes. Mol Biochem parasitol. 146(2):135-141.

PARAMCHUCK, W. J.; ISMAIL, S. O.; BHATIA, A.; GEDAMU, L. (1997) Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. Mol Biochem Parasitol. 90:203-221.

PARODI-TALICE, A.; DÚRAN, R.; ARRAMBIDE, N.; PRIETO, V.; PIÑEYRO, M. D.; PRITSCH, O.; CAYOTA, A.; CERVENANSKY, C.; ROBELLO, C. (2004) Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. Int J Parasitol. 34(8): 881-886.

PARTHASARATHY, M. V.; SLOBBE, W. G.; SOUDANT, C. (1976) Trypanosomatid flagellate in the phloem of diseased coconut palms. Scienc. 192:1346-1348.

PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. (2003) Proteomics: the first decade and beyond. Nat Genet. 33:311-323.

PAYS, E.; NOLAN, D. P. (1998) Expression and function of surface proteins in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol. 91(1):3-36.

PEREIRA, V. R.; LORENA, V. M.; NAKAZAWA, M.; LUNA, C. F.; SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; SOARES, M. B.; COUTINHO, E. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GOMES, Y. M. (2005) Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res.* 96(3):154-61.

PÉREZ-FUENTES, R.; GUÉGAN, J. F.; BARNABÉ, C.; LÓPEZ-COLOMBO, A.; SALGADO-ROSAS, H.; TORRES-RASGADO, E.; BRIONES, B.; ROMERO-DIAS, M.; RAMOS-JIMÉNES, J.; SÁNCHEZ-GUILLEN, M. C. (2003) Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *Int J Parasitol.* 33:293-299.

PETRY, K.; SCHOTELLIUS, J.; DOLLET, M. (1987) Differentiation de *Phytomonas* sp. and lower trypanosomatids (*Herpetomonas*, *Crithidia*) by agglutination tests with lectins. *Parasitol Res.* 74:1-4.

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A. (1999) Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol.* 193:90-98.

PINGE-FILHO, P.; PERON, J. P. S.; DE MOURA, T. R.; MENOLLI, R. A.; GRAÇA, V. K.; ESTEVÃO, D.; TADOKORO, C. E.; JANKEVÍCIUS, J. V.; RIZZO, L. V. (2005) Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide. *Immunol Lett.* 96:283-290.

PODLIPAIEV, S. (2001) The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. *Int J Parasitol.* 31(5-6):648-652.

RAETHER, W.; HÄNEL, H. (2003) Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis of zoonotic cestode infections: an update. *Parasitol Res.* 91(5):412-438.

RAPPAPORT, R. S.; DODGE, G. R. (1982) Prostaglandin E inhibits the production of human interleukin 2. *J Exp Med.* 155(3): 943-948.

RASSI, A. J. R.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. (2000) Chagas' heart disease. *Clin Cardiol.* 23(12):883-889.

RAY, D. S. (1989) Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. *Mol Cell Biol.* 9(3):1365-1367.

REDMAN, C. A.; SCHNEIDER, P.; MEHLERT, A.; FERGUSON, M. A. J. (1995) The glycoinositol-phospholipids of *Phytomonas*. *Biochem J.* 311:495-503.

RIDGLEY, E.; WEBSTER, P.; PATTON, C.; RUBEN, L. (2001) Calmodulin-binding properties of the paraflagellar rod complex from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 109(2):195-201.

ROBINSON, D. R.; GULL, K. (1991) Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. *Nature.* 352(6337):731-733.

ROCHA, G. C. G.; NICOLICH, R.; ROMEIRO, A.; MARGIS-PINHEIRO, M.; ATTIAS, M.; ALVES-FERREIRA, M. (2003) Effect of *Urtica dióica* agglutinin and *Arabidopsis thaliana* Chia4 chitinase on the protozoan *Phytomonas françai*. *FEMS Microbiol Lett.* 226(1):1-7.

ROITMAN, C.; ROITMAN, I.; AXEVEDO, H. P. (1972) Growth of an insect trypanosomatid at 37°C in a defined medium. *J Protozool.* 19:346-349.

ROMANHA, A. J.; ALVES, R. O.; MURTA, S. M.; SILVA, J. S.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T. (2002) Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. *J Infect Dis.* 186(6):823-828.

RUDENKO, G.; CHUNG, H. M. M.; PHAM, V. P.; VAN, D. E. R.; PLOEG, L. H. T. (1991) RNA polymerase I can mediate expression of CAT and NEO protein-coding genes in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* 10(11):3387-3397.

RYAN, K. A.; SHAPIRO, T. A.; RAUCH, C. A.; GRIFFITH, J. D.; ENGLUND, P. T. (1988) A knotted free minicircle in kinetoplast DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85(16):5844-5848.

SANCHEZ-MORENO, M.; LASZTITY, D.; COPPENS, I.; OPPERDOES, F. (1992) Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54(2):185-199.

SANCHES-MORENO, M.; FERNÁNDEZ-BECERRA, C.; ENTRALA, E.; OPPERDOES, F. R.; DOLLET, M.; OSUNA, A. (1995) In vitro culture of *Phytomonas* sp isolated from *Euphorbia characias*. Metabolic studies by ¹HNMR. *J Euk Microbiol.* 42(3):314-320.

SANTOS, A. L.; D'AVILA-LEVY, C. M.; DIAS, F. A.; RIBEIRO, R. O.; PEREIRA, F. M.; ELIAS, C. G. R.; SOUTO-PADRÓN, T.; LOPES, A. H. C. S.; ALVIANO, C. S.; BRANQUINHA, M. H.; SOARES, M. A. (2006) *Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion. *Int J Parasitol.* 36(1):47-56.

SCHINELLA, G. R.; TOURNIER, H. A.; PRIETO, J. M.; RÍOS, J. L.; BUSCHIAZZO, H.; ZAIDENBERG, A. (2002) Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth by medical plant extracts. *Fitoterapia.* 73:569-575.

SCHNEIDER, A. (2001) Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. *Int J Parasitol.* 31:1403-1415.

SCHNARE, M. N.; GRAY, M. W. (1999) A candidate U1 small nuclear RNA for trypanosomatid protozoa. *J Biol Chem.* 274(34):23691-23694.

SERRANO, M. G.; NUNES, L. R.; CAMPANER, M.; BUCK, G. A.; CAMARGO, E.; TEIXEIRA, M. M. G. (1999a) Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of genus-specific sequence of the spliced leader gene. *Exp Parasitol.* 91(3):268-279.

SERRANO, M. G.; CAMPANER, M.; BUCK, G. A.; TEIXEIRA, M. M. G.; CAMARGO, E. P. (1999b) PCR amplification of the spliced leader gene for the diagnosis of trypanosomatid parasites of plants and insects in methanol-fixed smears. *FEMS Microbiol Lett.* 176(1):241-246.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. (1995) The structure and replication of kinetoplast DNA. *Ann Rev Microbiol.* 49:117-143.

SHIOIRI, C.; TAKAHATA, N. (2001) Skew of mononucleotide frequencies, relative abundance of dinucleotides, and DNA strand asymmetry. *J Mol Evol.* 53(4-5):364-376.

SHLOMAI, J.; ZADOK, A. (1984) Kinetoplast DNA minicircles of trypanosomatids encode for a protein product. *Nucleic Acids Res.* 12(21):8017-8028.

SILVA, E. D.; PEREIRA, V. R.; GOMES, J. A.; LORENA, V. M.; CANCELO, J. R.; FERREIRA, A. G.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GOMES, Y. M. (2002) Use of the EIE-recombinant-Chagas-biomanguinhos kit to monitor cure of human Chagas' disease. *J Clin Lab Anal.* 16(3):132-136.

SIMPSON, L. (1986) Kinetoplast DNA in trypanosomid flagellates. *Int Rev Cytol.* 99:119-179.

SOUTO-PADRÓN, T. (2002) The surface charge of trypanosomatids. *An Acad Bras Cienc.* 74(4):649-675.

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

SOUZA, M. A.; CORTE REAL, S. (1991) Post nuclear kinetoplast in choanomastigotes of *Crithidia deanei* Carvalho, 1973 - Proposal of a new genus. *Rev Inst Med Trop.* 33(Supl.8).

SOUZA, T. A. C. B.; YAMADA-OGATTA, S. F. (2006) Clonagem e caracterização do gene Calmodulina de *Phytomonas serpens*. Dissertação de mestrado em Microbiologia na Universidade Estadual de Londrina.

STAHEL, G. (1931) Zur kenntnis der siebrohrenkrankheit (phloemnekrose) des kaffeebaumes in Surinam. I. Mikroskopische untersuchungen und infektions-versuche. *Phytopathol Z.* 4:65-82.

STUART, K.; ALLEN, T. E.; HEIDMANN, S.; SEIWER, S. D. (1997) RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61(1):105-120.

STUART, K.; PANIGRAHI, A. K. (2002) RNA editing: complexity and complications. *Mol Microbiol.* 45(3):591-596.

STURM, N. R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. (1989) Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol biochem Parasitol.* 33(3):205-214.

STURM, N. R.; FERNADES, O.; CAMPBELL, D. A. (1995) The mini-exon genes of three *Phytomonas* isolates that differ in plant tissue tropism. *FEMS Microbiol Lett.* 130:177-182.

SULSEN, V.; GUIDA, C.; COUSSIO, J.; PAVETO, C.; MUSCHIETTI, L.; MARTINO, V. (2006) *In vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. *Parasitol Res.* 98(4):370-374.

SUTTON, R. E.; BOOTHROYD, J. C. (1986) Evidence for trans-splicing in trypanosomes. *Cell*. 47:527-535.

TEIXEIRA, M. M. G.; CAMARGO, PLESSMANN. (1989) Monoclonal antibodies for the identification of tripanosomatids of the genus *Phytomonas*. *J Protozool*. 36(3):262-264.

TEIXEIRA, M. M. G.; CAMPANER, M.; CAMARGO, E. P. (1995) Characterization of the target antigens of *Phytomonas*-specific monoclonal antibodies. *J Microbiol*. 42(4):332-337.

TEIXEIRA, M. M. G.; SERRANO, M. G.; NUNES, L. R.; CAMPANER, M.; BUCK, G. A.; CAMARGO, E. P. (1996) Trypanosomatidae: A spliced- leader-derived probe specific for the genus *Phytomonas*. *Exp Parasitol*. 84:311-319.

TIELENS, A. G. M.; HELLEMOND, J. J. V. (1998) Differences in energy metabolism between Trypanosomatidae. *Parasitol Today*. 14(7):265-271.

TURRENS, J. F.; WATTS, B. P. Jr.; ZHONG, L.; DOCAMPO, R. (1996) Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by benzimidazole and anthelmintic imidazole derivatives. *Mol Biochem Parasitol*. 82(1):125-129.

TYLER-CROSS, R. E.; SHORT, S. L.; FLOETER-WINTER, L. M.; BUCK, G. A. (1995) Transiente expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. *Mol Biochem Parasitol*. 72:23-31.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*. 31(5-6):472-481.

UCHIYAMA, N.; MATSUNAGA, K.; KIUCHI, F.; HONDA, G.; TSUBOUCHI, A.; NAKAJIMA-SHIMADA, J.; AOKI, T. (2002) Trypanocidal terpenoids from *Laurus nobilis* L. *Chem Pharm Bull*. 50(11):1514-1516.

ULLU, E.; TSCHDI, C.; GUNZL, A. (1996) Trans-splicing in trypanosomatid protozoa. In: *Molecular Biology of Parasitic Protozoa* by SMITH DF, PARSONS M. IRL Press, Oxford University Press.

UMEZAWA, E. S.; SILVEIRA, J. F. (1999) Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94 Suppl 1:285-288.

- UMEZAWA, E. S.; BASTOS, S. F.; COURA, J. R.; LEVIN, M. J.; GONZALES, A.; RANGEL-ADÃO, R.; ZINGALES, B.; LUQUETTI, A. O.; DA SILVEIRA, J. F. (2003) An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion*. 43:91-97.
- URBINA, J. A. (1997) Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology*. 114 Suppl:S91-99.
- URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. (2003) Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *TRENDS Parasitol*. 19(11):495-501.
- UTTARO, A. D.; SANCHEZ-MORENO, M.; OPPERDOES, F. R. (1997) Genus-specific biochemical markers for *Phytomonas* spp. *Mol Biochem Parasitol*. 90:337-342.
- VANHAMME, L.; PAYS, E. (1995) Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev*. 59(2):223-240.
- VAN HELLEMOND, J. J.; SIMONS, B.; MILLENAAR, F. F.; TIELENS, A. G. (1998) A gene encoding the plant-like alternative oxidase is present in *Phytomonas* but absent in *Leishmania* spp. *J Eukaryot Microbiol*. 45(4):426-430.
- VATTUONE, N. H.; YANOVSKY, J. F. (1971) *Trypanosoma cruzi*: agglutination activity of enzyme- treated epimastigotes. *Exp Parasitol*. 30(3):349-355.
- VELOSO, V. M.; CARNEIRO, C. M.; TOLEDO, M. J.; LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W. L.; BAHIA, M. T. (2001) Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 96(7):1005-1011.
- VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. (1994) Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun*. 62(11):5177-5182.
- VOOGD, T. E.; VANSTERKENBURG, E. L.; WILTING, J.; JANSSEN, L. H. (1993) Recent research on the biological activity of suramin. *Pharmacol Rev*. 45:177-203.
- WESTENBERGER, S. J.; CERQUEIRA, G. C.; EL-SAYED, N. M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R. (2006) *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. *BMC genomics*. 7:60.

WHO- World Health Organization. (2002) Control of tropical disease. Chagas' disease. WHO, Geneva.

WILLIAMS, R. E.; BRUCE, N. C. (2002) New uses for an old enzyme- the old yellow enzyme family of flavoenzymes. *Microbiology*. 148:1607-1614.

YOSHIDA, N.; JANKEVÍCIUS, J. V.; ROITMAN, I.; CAMARGO, E. P. (1978) Enzymes of the ornithine-arginine metabolism of trypanosomatids of the genus *Herpetomonas*. *J Protozol.* 25:550-555.

ZOMERDIJK, J. C. B. M.; KIEFT, R.; BORST, P. (1991) Efficient production of functional mRNA mediated by RNA polymerase I in *Trypanosoma brucei*. *Nature*. 353:772-775.

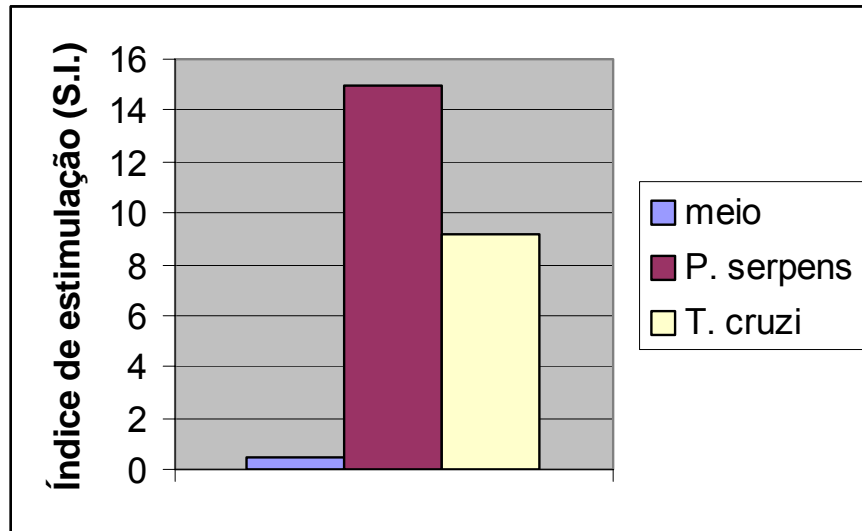
APÊNDICES

APÊNDICE A

**Ensaio de linfoproliferação de camundongos BALB/c
previamente imunizados com *P. serpens* 15T induzido
por antígenos de *P. serpens* e *T. cruzi***

APÊNDICE A –

Ensaio de linfoproliferação de camundongos BALB/c previamente imunizados com *P. serpens* 15T induzido por antígenos de *P. serpens* e *T. cruzi*.



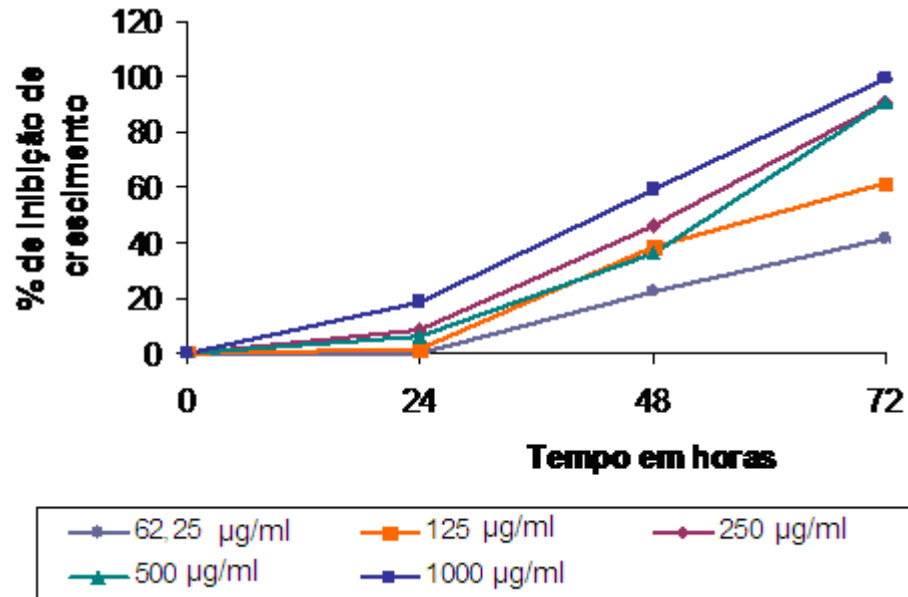
Avaliação da resposta linfoproliferativa de camundongos BALB/c para antígenos de *P. serpens* e *T. cruzi*. Camundongos BALB/c receberam uma dose subcutânea com 5×10^7 formas promastigotas de cultura de *P. serpens* com Adjuvante Completo de Freund's (CFA) v/v. 14 dias após a imunização linfócitos dos linfonodos inguinais e popliteais foram isolados e usados nos ensaios de linfoproliferação. Após a contagem dos linfócitos e avaliação da viabilidade celular (por coloração com azul de Trypan), $2,5 \times 10^5$ células foram colocadas em cada poço juntamente com RPMI 1640 contendo meio completo (20mM NaHCO_3 , 10 mM HEPES, 100U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, 2 mM L-glutamina, 50 μM de β -mercaptoetanol, 5 mM de piruvato de sódio, 100 μM de aminoácidos não essenciais e 0.5% de soro normal de camundongo). Extrato celular de *P. serpens* (formas promastigotas da amostra 15T) e *T. cruzi* (formas epimastigotas da cepa CL) correspondendo a 1×10^7 parasitas obtidos na fase log de crescimento em seus respectivos meios de cultura foram testados na cultura de linfócitos. As culturas foram incubadas por 96h à 37°C em câmara úmida contendo 5% de CO_2 . As células foram marcadas com $1\mu\text{Ci}$ de [^3H] timidina ([^3H] TdR-86 Ci/mmol, Amersham) em cada poço 18 h antes de serem coletadas em papel de fibra de vidro. ^3H -TdR incorporada foi medida em β - cintilador. Os resultados são representativos de três experimentos e o índice de estimulação foi determinado pela divisão da média das contagens das células estimuladas por antígenos em triplicata pela média das contagens por minuto do meio controle. O gráfico mostra que um alto índice de estimulação (S.I.), igual a 15 foi obtido na presença de extrato total de *P. serpens* (antígenos homólogos). Antígenos de *T. cruzi* também induziram significativa resposta linfoproliferativa (S.I. igual a 9.2) em camundongos BALB/c imunizados com *P. serpens*.

APÊNDICE B

Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico de *Erythrina speciosa* (Andrews) em formas promastigotas de *P. serpens*.

APÊNDICE B –

Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico de *Erythrina speciosa* (Andrews) em formas promastigotas de *P. serpens*.



Determinação da porcentagem de inibição de crescimento (IC) do extrato etanólico de *E. speciosa* sobre *P. serpens*. Formas promastigotas de *P. serpens* cultivadas em meio GYPMI em fase log de crescimento foram incubadas em placas de 96 poços à densidade de 5×10^5 células em diferentes concentrações do extrato (1000, 500, 250, 125 e 62,25 µg/ml) e na ausência, grupo controle (*P. serpens* + meio). Os sistemas foram incubados a 28°C e a contagem direta das células foi realizada em câmara hematimétrica (Neubauer Improved Chamber) a cada 24h durante 3 dias. No gráfico é possível observar uma atividade antiproliferativa dose e tempo dependente do extrato etanólico de *E. speciosa* sobre formas promastigotas de *P. serpens* 15T.

APÊNDICE C

**Artigo científico: *In vitro* trypanocidal activity of
Erythrina speciosa (Andrews) is not related with control
of infection in Swiss mice**

APÊNDICE C –**ARTIGO CIENTÍFICO:**

***In vitro* trypanocidal activity of *Erythrina speciosa* (Andrews) is not related with control of infection in Swiss mice**

Viviane K. Graça-de Souza, Aparecida D. Malvezi, Rafael Andrade Menolli, Ivo Marguti, Luiz Vicente Rizzo, Suelli Fumie Yamada-ogatta, Teresinha de Jesus Faria, Phileno Pinge-Filho.



In vitro trypanocidal activity of *Erythrina speciosa* (Andrews) is not related with control of infection in Swiss mice

Journal:	<i>Parasitology Research</i>
Manuscript ID:	PR-2005-0268
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	03-Jul-2005
Complete List of Authors:	Graça-de Souza, Viviane; Universidade Estadual de Londrina, Microbiologia Malvezi, Aparecida; Universidade Estadual de Londrina, Ciências Patológicas Menoli, Rafael; Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Ciências Médicas e Farmacológicas Marquê, Ivo; Universidade de São Paulo, Imunologia Rizzo, Luiz; Universidade de São Paulo, Imunologia Yamada-Ogatta, Sueli; Universidade Estadual de Londrina, Microbiologia Faria, Teresinha; Universidade Estadual de Londrina, Química Pino-Filho, Phileno; Universidade Estadual de Londrina, Ciências Patológicas
Keywords:	Chagas' disease, Trypanosoma cruzi, Erythrina speciosa, Nitric oxide, Macrophages, Chemotherapy

powered by ScholarOne
Manuscript Central™

1
2
3
4
5 ***In vitro* trypanocidal activity of *Erythrina speciosa* (Andrews) is not related**
6 **with control of infection in Swiss mice**
7

8
9 Viviane K. Graça-de Souza^b, Aparecida D. Malvezi^a, Rafael Andrade Menolli^c, Ivo Marguti^d,
10 Luiz Vicente Rizzo^d, Sueli Fumie Yamada-Ogatta^b, Teresinha de Jesus Faria^e, Phileo Pinge-
11 Filho^{a*}
12

13 ^aDepartamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade
14 Estadual de Londrina, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

15 ^bDepartamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de
16 Londrina, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

17 ^cCentro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
18 CEP: 85814-110, Cascavel, Paraná, Brasil.

19 ^dDepartamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

20 ^eDepartamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina,
21 Cx. Postal 6001, 86051-990 Londrina, Paraná, Brasil.
22

23
24
25 **Key words:** *Trypanosoma cruzi*; Chagas' disease; *Erythrina speciosa*; Nitric oxide;
26 *Macrophages*; Chemotherapy
27

28
29
30 ***Corresponding author:** Mailing address: Dr. Phileo Pinge-Filho Departamento de
31 Ciências Patológicas, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid
32 (PR 445, Km 380), Londrina (PR), CEP: 86051-990, Brazil. Phone: + 55 43 3371-4267;
33 Fax: + 55 43 3327-2979.

34 *E-mail address:* pingefilho@uel.com.br (P. Pinge-Filho)
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

We evaluated the anti-trypansomal activity of an ethanolic extract of *Erythrina speciosa* Andr. (Leguminosae-Papilionoideae) (Et-Es) on epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Et-Es, at 250 to 1000 $\mu\text{g/mL}$, inhibited *T. cruzi* growth by 50 to 75% after 72 h incubation. Daily administration of Et-Es (50mg/kg body weight) in Swiss mice, beginning 4 h after inoculation with 5×10^3 trypomastigote forms of *T. cruzi*, provoked a significant increase in parasitemia when compared to non-treated infected mice. Infected mice survived for 16 days after inoculation. Infected mice treated with Et-Es showed 100% mortality but survived longer (day 22 post infection). In addition, we determined the effect of Et-Es on hematological parameters and nitric oxide production (NO). Infected mice showed a slight anemia and increase in NO production by macrophages from the peritoneal cavity, which were not modified by treatment with Et-Es. These studies indicate that *in vitro* trypanocidal activity of Et-Es is not relevant to the control of infection in mice.

Introduction

Chagas' disease or South American trypanosomiasis, caused by the flagellate protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, represents the third largest tropical disease burden after malaria and schistosomiasis. This is a chronic disease but can sometimes develop very rapidly and be fatal in infected individuals, as happened recently in Navegantes in the south of Brazil, when 25 people were infected (of which five died) after they consumed sugarcane juice containing metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi* (Ianni and Mady, 2005). Although great advances are being made to control disease transmission, such as vector chemical attack or systemic screening of blood donors, more effective chemotherapy is needed for people who become infected (Rodriguez Coura and de Castro 2002; Sulsen et al. 2005). The primary drugs nifurtimox and benznidazol have been in use for 40 years and are ineffective in the chronic phase of parasitemia and are poorly tolerated.

The development of new, safer and more effective trypanocidal compounds is still a challenge because these drugs are not given high priority by the R&D-based pharmaceutical industry (Troullier et al. 2002). Thus, the use of natural products with recognized low toxicity and potent antioxidative activity may be more appropriate than synthetic antioxidants if their trypanocidal activity against the infective but non-dividing blood form of *T. cruzi* proves to be

adequate (Campos, et al. 2005). Screening natural products offers the chance to discover new compounds of unique structure with high activity and selectivity (Kayser et al. 2003, Sulsen et al., 2005).

The genus *Erythrina* (Leguminosae) includes approximately 120 species, which occur in tropical and subtropical regions. *Erythrina speciosa* is a small tree, which is native to Brazil and has potential use in environmental recomposition. Extracts of *Erythrina* species have cyclooxygenase inhibitory (Pillay et al., 2001) and anti-bacterial (Holetz et al. 2002) activities.

Prostaglandins (PG) are involved in a complex pathway that controls lymphoproliferative and cytokine responses in *T. cruzi* infection (Pinge-Filho et al. 1999). Additional investigations have suggested that cyclooxygenase inhibitors have potential therapeutic application in the control of parasite replication and spread in Chagas' disease (Freire-de-Lima et al. 2000; Michelin et al. 2005).

Infection of susceptible mice with Y strain of *T. cruzi* is characterized by an exponential growth of parasites and very high mortality and is associated with hematological changes, including anemia (Cardoso and Brener, 1980; Marcondes et al., 2000; Malvezi et al. 2004).

All these observations opened the possibility of studying the effect of *E. speciosa* on epimastigote forms of *T. cruzi*, blood parasite load and survival in acute infection, nitric oxide production and hematological parameters in non-treated and Et-Es-treated *T. cruzi*-infected animals.

Material and Methods

Plant material and preparation of extract

Leaves of *E. speciosa* were collected in October 2000 in Paraná State in the south of Brazil, and a voucher specimen (No. FUEL 35133) has been deposited at the State University of Londrina Herbarium. The dried leaves (180 g) were extracted with ethanol (EtOH) at room temperature. The ethanolic extract obtained was evaporated under vacuum. The crude EtOH extract (17 g) (Et-Es) was stored at 4 °C and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at the moment of use. The final DMSO concentration was less than 0.5%.

In vitro bioassays with epimastigote forms of *T. cruzi*

The stock solutions (10 mg/mL) of Et-Es were prepared in 10% DMSO (v/v) and added aseptically only once to growth medium at a concentration range of 250-1000 µg/ml. Epimastigote forms of *T. cruzi* Y strain (Silva and Nussenweig, 1953) in logarithmic growth phase (5×10^5 cells/ml) were cultured in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Camargo, 1964) and determined Et-Es concentrations. Benznidazole (100 µg/ml) was used as positive control. The cultures were incubated at 28 °C, parasites were counted after 72 h in a Neubauer chamber, and the growth rate (GR) was calculated according to Muelas-Serrano et al., (2000). Antiprotozoal activity was expressed as percent growth inhibition (%GI) calculated with respect to growth controls.

Animals and *T. cruzi* infection

Swiss mice (20-30g) of either sex from the breeding colony of the Central Animal House of the State University of Londrina, Paraná, Brazil, were maintained under standard environmental conditions (22 ± 1 °C, relative humidity $60 \pm 5\%$, 12h light/dark cycle). Commercial rodent diet (Nuvilab-CR1, Nuvital, Campo Mourão, Brazil) and sterilized water were available *ad libitum*. All procedures with the animals were in accordance with the guidelines of the Brazilian Code for Use of Laboratory Animals.

T. cruzi Y strain was maintained by weekly intraperitoneal (i.p) inoculation of Swiss mice with 2×10^5 blood trypomastigote forms. For *in vivo* bioassays, infective trypomastigotes were obtained from these mice by drawing blood via cardiac puncture following anesthetization. The parasites were counted and 5×10^3 cells were injected i.p into Swiss mice. Parasitemia was assessed by counting circulating parasites in 5 mL of blood obtained from the tail vein of infected mice. These data were expressed as the number of parasites per milliliter of blood (Brener, 1962). Parasitemia and survival rates were determined daily, beginning on the 5th day of infection.

In vivo bioassays and hematological analyses

Infected Swiss mice received daily saline, i.p or orally with (treated group) or without (control group) Et-Es (50 mg/kg body weight) 4 h after *T. cruzi* infection until the 15th day. Red cells and leukocytes, collected by cardiac puncture under ether anesthesia, were counted by standard methods (Malvezi, et al, 2004). The hemoglobin concentration was determined by the modified Drabkin method. The hematocrit was determined by microcentrifugation of capillary tubes filled with heparinized blood (Bain, 1997).

Macrophage cell culture and nitric oxide measurement

Macrophages were obtained from Swiss mice after an i.p injection of sterile 5% thioglycolate (TG) broth (1 ml). Mice were killed by cervical dislocation, and cells were collected by washing the peritoneum with cold PBS (8 ml). The macrophage populations from individual mice were enriched by adherence to plastic in 96 well plates (Linbro, ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA) with approximately 10⁶ peritoneum exudate cells per well. Non-adherent cells were removed after 120 min incubation, and the macrophages were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen-Gibco, New York, USA) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Cultilab, São Paulo, Brasil), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml). Cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. More than 95% of the cells were viable as determined by exclusion of 0.2% trypan blue (Invitrogen-Gibco, New York, USA) also after incubation with all reagents. The macrophage monolayers were then covered with culture medium (200µl) with Et-Es at a concentration of 0-100 µg/ml and LPS (100 ng/ml), and incubated for 24 h under the same conditions as described above. In all experiments, each concentration of Et-Es was tested in triplicate. Control macrophages were cultured in the same medium minus Et-Es. No toxic effect of DMSO or ethanol at 0.5% final concentration was observed.

Nitric oxide (NO) production was determined by measuring nitrite accumulation in culture supernatants by the Griess colorimetric reaction, as previously described by Stuehr and Nathan, (1989). The nitrite content was measured in duplicate serially diluted samples by adding 50 µl of freshly prepared Griess reagent (1.0% sulfanilamide and 0.05% N-(1-naphthyl)- ethylenediamine in 2.5% phosphoric acid at room temperature) to 50 µl of the

1
2
3
4 samples in 96-well plates. The OD was read at 550 nm after 10 min, and nitrite levels were
5 determined by comparison with standard curves of sodium nitrite diluted in complete culture
6 medium where; the minimal detectable concentration was 1.5 mM. All reagents for the nitrite
7 assay were obtained from Sigma Chemical Co (St Louis, USA).
8
9
10
11
12

13 Statistical analysis

14
15
16
17 Data are expressed as means \pm standard deviation. The impact of infection and
18 treatments were determined by two-way and one-way analysis of variance (ANOVA). When
19 significant main effects were noted, differences between individual groups were tested using
20 Bonferonni multiple comparisons method. Survival curves were compared using the Mantel-
21 Haenszel log rank test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version
22 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).
23
24
25
26
27
28

29 Results and discussion

30
31
32
33 *In vitro* and *in vivo* screens play a critical role in the identification and evaluation of
34 new drugs against *T. cruzi*. For most diseases, the aim of using the animal model is to find a
35 drug that can be administered orally, be effective in a short course (< 10 days) and show no
36 indication of toxicity at the highest doses tested (100 mg/kg).
37
38
39

40 In our study, the anti-trypansomal activity of Et-Es was assessed *in vitro* against
41 epimastigote forms of *T. cruzi*, and the results are shown in Figure 1. Et-Es at 250 μ g/ml, 500
42 μ g/ml and 1000 μ g/ml inhibited 50, 60 and 75% of epimastigote growth, respectively. In
43 agreement with our results, Luize et al, 2005, observed that Et-Es at 100 μ g/ml inhibited the
44 growth of *T. cruzi* Y strain and *Leishmania (L) amazonensis* by about 25%. Benznidazole
45 showed a trypanocide activity of 100% at 100 μ g/ml against epimastigotes from *T. cruzi* Y
46 strain, Figure 1.
47
48
49
50
51
52

53 We further examined the effect of Et-Es on *T. cruzi*-infected mice. Swiss mice
54 infected with the Y strain of *T. cruzi* exhibited the classical pattern of parasitemia and survival
55 rate, as previously described (Brener, 1962; Malvezi, et al, 2004). Oral and intra-peritoneal
56 treatment with 50 mg of Et-Es/kg body weight led to a statistically significant increase in
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

parasitemia, as compared with the control group (Figure 2a). No significant differences were detected when comparing the survival of the animals (Figure 2b).

In addition, we conducted blood cell counts by measuring some hematological parameters and nitrite production by macrophages from non-infected and *T. cruzi*-infected mice treated or not with Et-Es for 15 days post-infection. Based on decreases in hemoglobin (13.1 ± 1.0 versus 10.7 ± 1.5 , $P < 0.05$) and hematocrit (41.6 ± 2.5 versus 35.5 ± 3.8 , $P < 0.05$) numbers, the mouse strain studied suffered a slight anemia 14 days post-infection, which was not modified by treatment with Et-Es (Table 1, $P > 0.05$).

Treatment of uninfected and infected mice with 50 mg of Et-Es/kg body weight for 15 days did not alter nitrite production by thioglycolate-elicited peritoneal macrophages incubated only in the presence of medium (Figure 3, $P > 0.05$). This finding was not modified when the macrophages taken from infected mice were activated with LPS, when compared to the corresponding non-treated group (Figure 3, $P > 0.05$). Macrophages elicited in the same way and taken from normal Swiss mice treated with Et-Es and activated with LPS released high levels of nitrite ($15.1 \pm 4.7 \mu\text{M}/\text{mL}$), when compared to the corresponding non-treated group ($7.9 \pm 1.1 \mu\text{M}/\text{mL}$) (Figure 3, $P < 0.05$).

When macrophages from normal mice elicited with TG were incubated with Et-Es (0 to $100 \mu\text{g}/\text{mL}$) and LPS ($100 \text{ng}/\text{mL}$) for 24 h, the cell viability was above 90% by trypan blue exclusion and Et-Es did not modify nitrite production levels by activated macrophages (data not shown).

We did not investigate the mechanism by which the treatment of the infected mice with Et-Es increased the parasitemia. However, it is possible that it involves the modulation of prostaglandin production as previously described by Pillay et al. (2001) for extracts of African *Erythrina* species, or immunosuppression as has been observed during *T. cruzi* infection (Pinge-Filho et al, 1999; Zuniga et al, 2005; Michelin et al, 2005). However, others found that the inhibition of the prostaglandin synthesis reduced the parasitemia of *T. cruzi*-infected mice (Freire-de-Lima et al., 2002; Michelin et al., 2005). Another possibility is that inhibition of COX-2 could also inhibit iNOS, as demonstrated by Cieslik et al. (2002) and Moon et al. (2004), which could then explain the observed increase in parasitemia in infected mice treated with Et-Es. In fact, there is experimental evidence that nitric oxide production by iNOS is essential for host defense against acute *T. cruzi* infection (Vespa et al., 1994; Petray

et al., 1995; Silva et al., 2003; Pinge-Filho et al., 2005). Unexpectedly, our data showed that Et-Es did not reduce the production of nitrite by macrophages activated by LPS.

Further studies are necessary to investigate a possible interfering effect of Et-Es on signaling pathways for the induction of iNOS, COX-2 and molecules such as nuclear factor (NF) κ B to elucidate its possible mechanisms of therapeutic action.

In conclusion, our results indicate that the *in vitro* trypanocidal activity of Et-Es is not involved in the control of infection in mice, which suggests that the determination of anti-trypomastigote activity is not a sufficient criterion for selecting medicinal plants with anti-*T. cruzi* potential. Thus, it is essential to carefully define the parameters of *in vitro* and *in vivo* assays and to ensure that they are validated with standard drugs before they are used in drug screens.

Acknowledgements

We thank Dr. Albert Leyva for reading the manuscript. This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPPG) of Universidade Estadual de Londrina (UEL). V.G.K.S. has received fellowship from Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). L.V. Rizzo is a recipient of a personal grant for scientific achievement from CNPq and FAPESP.

References

- Bain BJ (1997) Células Sanguíneas: Um guia prático, 2ª Ed., pp 25-51. Porto Alegre, Artes Médicas Sul LTDA.
- Brener Z (1962) Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop S. Paulo 4: 389-396
- Camargo EP (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. 1. Origin of metacyclic trypansomes in liquid media. Rev Inst Med Trop São Paulo 6: 93-100
- Campos FR, Januário AH, Rosas LV, Nascimento SKR, Pereira PS, França SC, Cordeiro MSC, Toldo MPA, Albuquerque S (2005) Trypanocidal activity of extracts and fractions of *Bertholletia excelsa*. Fitoterapia 76(1):26-9

- 1
2
3
4 Cardoso JE, Brener Z (1980) Hematological changes in mice experimentally infected with
5 *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 75:97-104
6
7
8 Cieslik K, Zhu Y, Wu KK (2002) Salicylate suppresses macrophage nitric-oxide synthase-2
9 and cyclo-oxygenase-2 expression by inhibiting CCAAT/enhancer-binding protein-beta
10 binding via a common signaling pathway. J Biol Chem 277(51):49304-10
11
12 Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello
13 FG, Dos Reis GA, Lopes MF (2000) Uptake of apoptotic cells drives the growth of a
14 pathogenic trypanosome in macrophages. Nature 403(6766):199-203
15
16 Holecz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Filho BP (2002) Screening
17 of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases.
18 Mem Inst Oswaldo Cruz 97(7):1027-31
19
20 Ianni MB, Mady C. (2005) "Como era gostoso o meu caldo de cana..." Arq Bras Card 85 (6):
21 379-381
22
23 Kayser O, Kiderlen A, Croft S (2003) Natural products as antiparasitic drugs. Parasitol Res
24 90:S55-S62
25
26 Luize PS, Tiuman TS, Morello LG, Maza PK, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Cortez DAG,
27 Mello JCP, Nakamura CV (2005) Effects of medicinal plant extracts on growth of
28 *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. Braz J Pharmaceutical Sc
29 41(1):86-94
30
31 Malvezi AD, Cecchini R, de Souza F, Tadokoro CE, Rizzo LV, Pinge-Filho P (2004)
32 Involvement of nitric oxide (NO) and TNF-alpha in the oxidative stress associated with
33 anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. FEMS Immunol Med Microbiol
34 41:69-77
35
36 Marcondes MCG, Borelli P, Yoshida N, Russo M (2000) Acute *Trypanosoma cruzi* infection
37 is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia:
38 reversal by nifurtimox treatment. Microbes Infect 2:347-352
39
40
41 Michelin MA, Silva JS, Cunha FQ (2005) Inducible cyclooxygenase released prostaglandin
42 mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi*
43 infection. Exp Parasitol 111(2):71-9
44
45
46 Moon C, Ahn M, Jee Y, Heo S, Kim S, Kim H, Sim KB, Koh CS, Shin YG, Shin T (2004)
47 Sodium salicylate-induced amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in
48 Lewis rats is associated with the suppression of inducible nitric oxide synthase and
49 cyclooxygenases. Neurosci Lett 356(2):123-6
50
51
52 Muelas-Serrano S, Nogal JJ, Martínez-Díaz RA, Escario JA, Martínez-Fernández AR,
53 Gómez-Barrio A (2000) In vitro screening of american plant extracts on *Trypanosoma*
54 *cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. J Ethnopharmacol 71(1-2):101-7
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 Petray P, Cataños-Velez E, Gristein S, Öm A, Rottenberg ME (1995) Role of nitric oxide in
5 resistance and histopathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*.
6 Immunol Lett 47:121-126.
7
8
9 Pillay CCN, Jäger AK, Mulholland DA, van Staden J (2001) Cyclooxygenase inhibiting and
10 anti-bacterial activities of South African *Erythrina* species. J Ethnopharmacol 74(3):231-7
11
12
13 Pinge-Filho P, Tadokoro CE, Abrahamsohn IA (1999) Prostaglandins mediate suppression of
14 lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection.
15 Cell Immunol 193:90-8
16
17 Pinge-Filho P, Peron JPS, de Moura TR, Menolli RA, Graça VK, Estevão D, Tadokoro CE,
18 Jankevicius JV, Rizzo LV (2005) Protective immunity against *Trypanosoma cruzi*
19 provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide Immunol
20 Lett 96: 283-290
21
22
23 Rodriguez Coura J, de Castro S (2002) A critical review on Chagas disease chemotherapy.
24 Mem Inst Oswaldo Cruz 97(1):3-24
25
26
27 Silva JS, Vespa GNR, Cardoso MAG, Aliberti JC, Cunha FQ (1995) Tumor necrosis factor
28 alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice by inducing nitric oxide
29 production in infected IFN- γ -activated macrophages. Infect Immun 63:4862-4867.
30
31
32 Silva LHP, Nussensweig V (1953) Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente
33 virulenta para o camundongo branco. Folha Clínica Biológica 20: 191-207
34
35
36 Sulsen V, Guida C, Coussio J, Paveto C, Muschiatti L, Martino V (2006) In vitro evaluation
37 of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. Parasitol Res
38 98(4): 370-374
39
40
41 Stuehr DJ, Nathan CF (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis
42 and respiratory inhibition in tumor target cells. J Exp Med 169 (5):1 543- 1555
43
44
45 Trollier P, Olliaro P, Torreale E, Orbinski J, Laing R, Ford N (2002) Drug development for
46 neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. Lancet 359:2188-
47 2194
48
49
50 Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS (1994) Nitric oxide is involved in the control of
51 *Trypanosoma cruzi* induced parasitaemia and directly kills parasite in vitro. Infect Immun
52 62:5177-5182
53
54
55 Zuniga E, Acosta-Rodriguez E, Merino MC, Montes C, Gruppi A (2005) Depletion of
56 immature B cells during *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of myeloid cells and
57 the cyclooxygenase pathway. Eur J Immunol 35(6):1849-58
58
59
60

Figure Legends

Fig. 1. Susceptibility of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes (Y strain) to Et-ES (250 μ g/mL to 1000 μ g/mL) and benznidazole (100 μ g/mL) expressed as % Growth Inhibition (GI) regarding untreated controls. The values are mean \pm standard deviation (SD) of GI obtained in four assays done in duplicate. Differences in percentage of % GI were analysed by One-way analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison test. Means not sharing a letter differ, $P < 0.05$.

Fig. 2. Effect of Et-Es treatment on parasitemia (A) and survival (B) of mice infected with *T. cruzi*. Swiss mice were infected with 5×10^3 blood trypomastigotes Y strain *T. cruzi* and injected i.p daily with Et-Es (50mg/Kg) from 4 hours after of infection or left untreated as controls. Mean \pm standard deviation for ten mice per group, in an experiment representative of three similar experiments. * $P < 0.05$, significant difference in parasitemia.

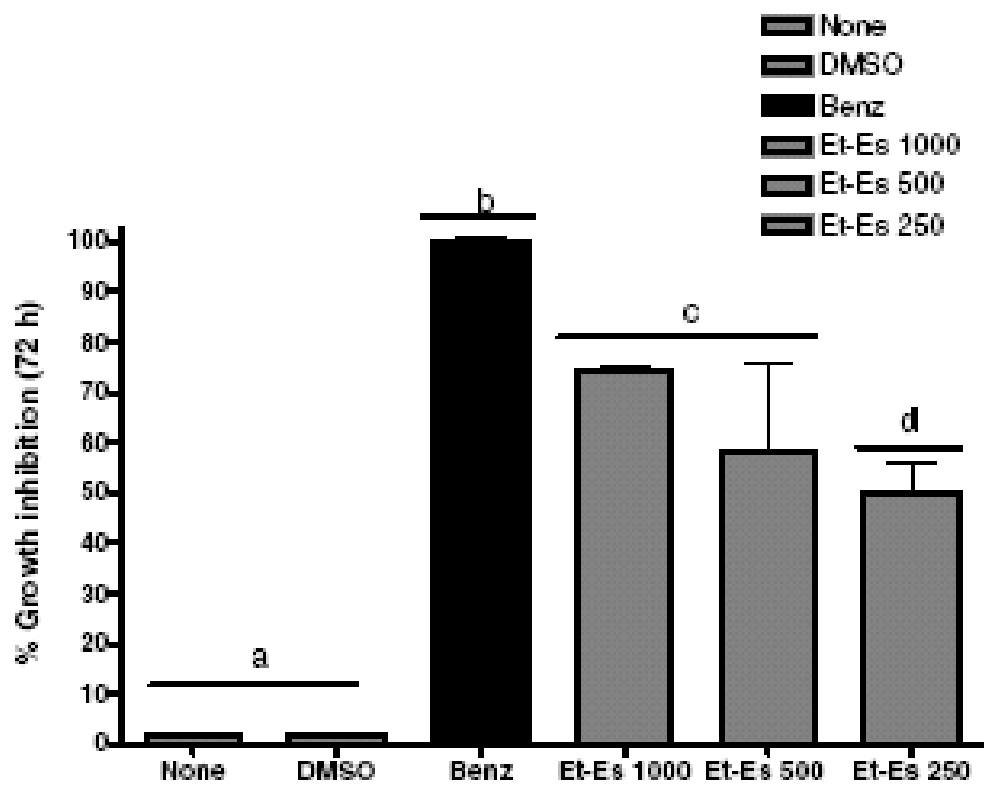
Fig. 3. Nitrite production by peritoneal macrophages obtained from normal and infected Swiss mice, treated or not with Et-Es (50mg/Kg/body weight) by oral rout and inoculated with thioglycolate (4th day). Macrophages were seeded in 96 well tissue-culture plates at 2×10^5 RPMI with or without the addition of LPS (100ng/mL). Nitrite was measured after 24 h of incubation. Data are expressed as the mean nitrite concentration \pm SD recorded for triplicate samples from tree different animals. Means not sharing a letter differ, $P < 0.05$.

Table 1. Hematological values^v in *T. cruzi*-infected mice^{**}.

Groups	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Erythrocytes ($\times 10^6$)	Leukocytes ($\times 10^5$)
Swiss mice				
N	13.1 \pm 1.0	41.6 \pm 2.5	7.4 \pm 0.6	4.7 \pm 1.0
NTip	12.3 \pm 0.3	37.0 \pm 1.7	6.7 \pm 0.5	4.6 \pm 0.2
NTvo	14.1 \pm 1.0	41.0 \pm 2.5	7.1 \pm 0.5	4.5 \pm 0.9
I	10.7 \pm 1.5*	35.5 \pm 3.8*	6.4 \pm 0.5	4.5 \pm 0.9
ITip	10.8 \pm 0.7*	33.0 \pm 1.5*	6.3 \pm 0.2	4.5 \pm 0.2
ITvo	10.7 \pm 1.5*	33.5 \pm 3.7*	6.2 \pm 0.6	4.5 \pm 0.9

^vHematological values on day 14 of *T. cruzi* infection. ^{**} Groups of Swiss mice were infected or not with 5×10^3 *T. cruzi* and treated or not with Et-Es (50mg/Kg of body weight) 4 h after infection. (N) Normal mice; (N Tip) Normal mice treated intraperitoneally with Et-Es; (N Tvo) Normal mice treated orally with Et-Es; (I) infected mice; (ITip) infected mice and treated intraperitoneally with Et-Es; (ITvo) infected mice and treated orally with Et-Es. Values represent the mean \pm SD and are representative of two independent experiments, using 5 to 12 mice per group * Significantly different ($P < 0.05$) when compared with non-infected group.

Figure 1



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 2

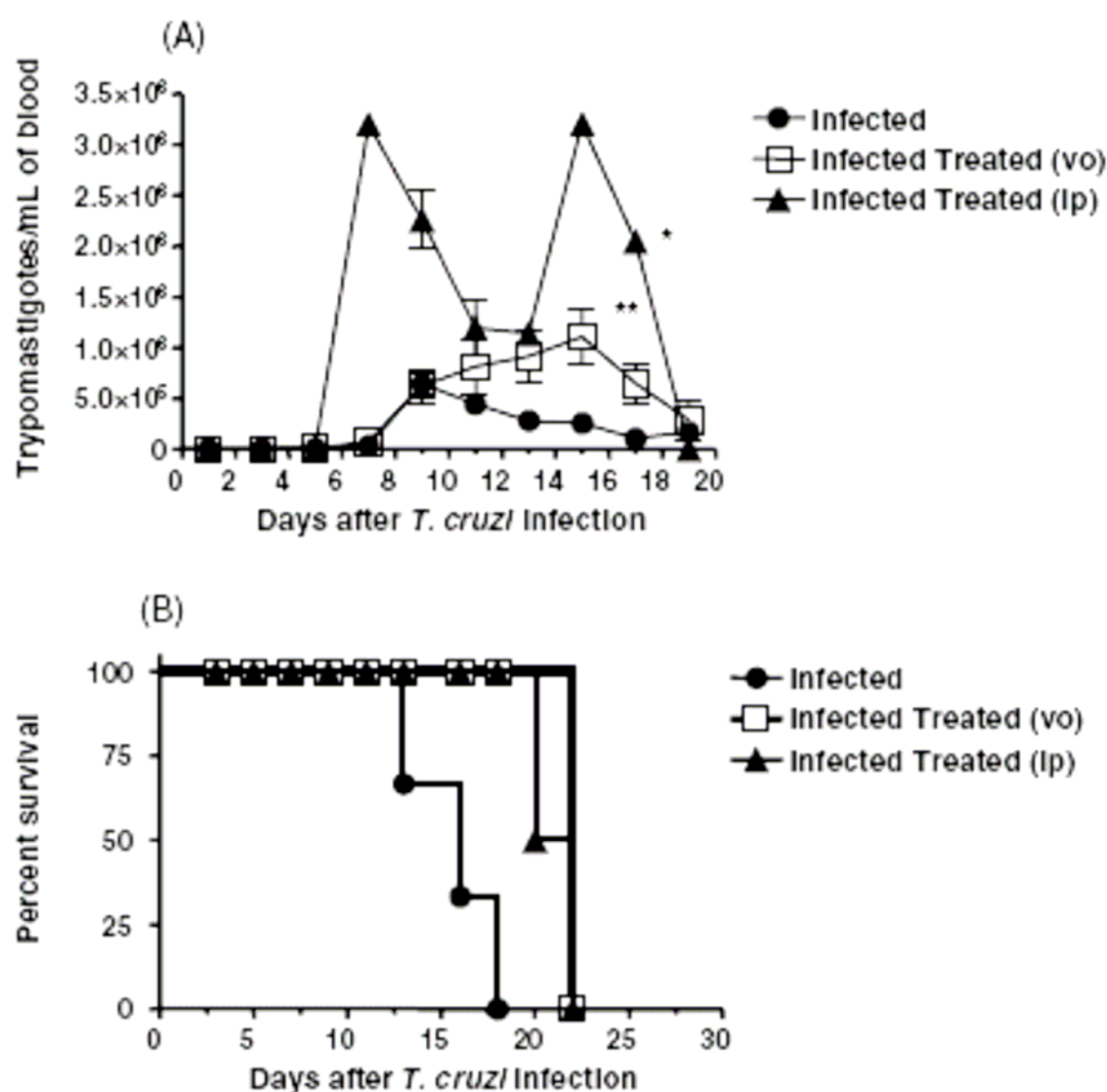
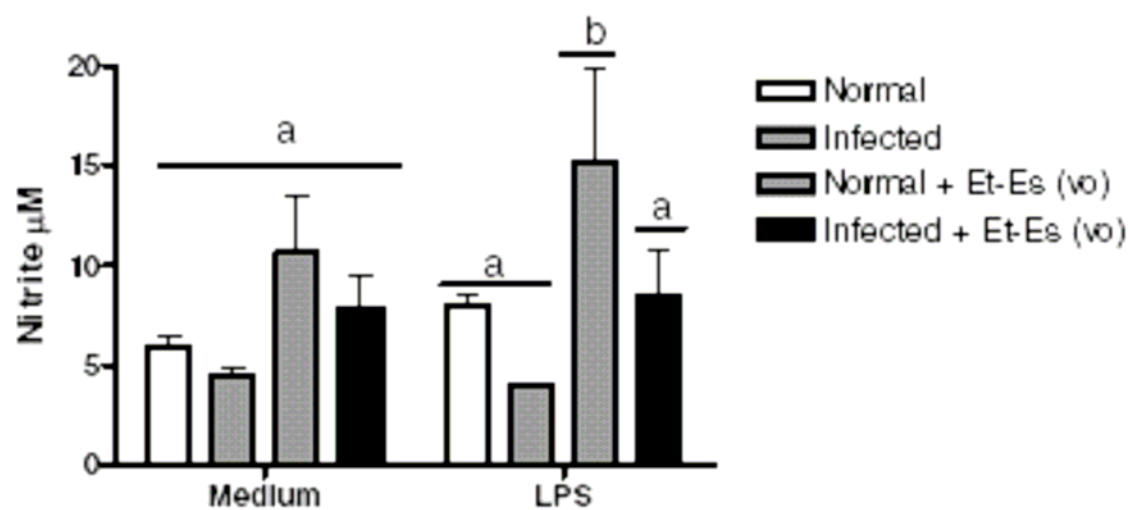


Figure 3



APÊNDICE D

**Artigo científico: Sera from patients with Chagas' disease
react with antigens of the tomato parasite *Phytomonas
serpens*: a proteomic view**

APÊNDICE D –**ARTIGO CIENTÍFICO:****Sera from patients with Chagas' disease react with antigens of the tomato parasite *Phytomonas serpens*: a proteomic view**

Viviane Krominski Graça-de Souza, Viviane Monteiro-Góes, Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza, Paulo Roberto Ceridório Corrêa, Patrício Manque^c, Gregory A. Buck, Andréa Rodrigues Ávila, Lucy Megumi Yamauchi, Phileo Pinge-Filho, Samuel Goldenberg, Marco Aurélio Krieger and Sueli Fumie Yamada-Ogatta.

Sera from patients with Chagas' disease react with antigens of the tomato parasite *Phytomonas serpens*: a proteomic view

Viviane Krominski Graça-de Souza^a, Viviane Monteiro-Góes^b, Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza^a, Paulo Roberto Ceridório Corrêa^a, Patrício Manque^c, Gregory A. Buck^c, Andréa Rodrigues Ávila^b, Lucy Megumi Yamauchi^a, Phileno Pinge-Filho^d, Samuel Goldenberg^b, Marco Aurélio Krieger^b, Sueli Fumie Yamada-Ogatta^{a,*}

^a Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid s/n, Campus Universitário, 86051-990, Londrina, Paraná, Brazil.

^b Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Avenida Algacyr Munhoz Mader 3775, Cidade Industrial, 81350-010, Curitiba, Paraná, Brazil. Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro – RJ, Brazil

^c Center for the Study of Biological Complexity, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia 23284-2030. Department of Microbiology and Immunology, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia 23298-0678, USA.

^d Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid s/n, Campus Universitário, 86051-990, Londrina, Paraná, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: +55 43 3371 4297; fax: + 55 43 3371 4788

E-mail address: ogatta@uel.br (S.F.Yamada-Ogatta).

Abstract

The genus *Phytomonas* comprises trypanosomatids that can parasitize a broad range of plant species. These flagellates can cause diseases in some plant families with a wide geographic distribution, which can result in great economic losses. We have demonstrated previously that *Phytomonas serpens* 15T, a tomato trypanosomatid, shares antigens with *Trypanosoma cruzi*, the agent of human Chagas' disease. A proteomic study was carried out to identify proteins of *P. serpens* 15T that are recognized by sera from patients with Chagas' disease. After 2D-electrophoresis of whole-cell lysates, 31 peptides were selected and analyzed by tandem mass spectrometry (MS/MS). Twenty eight peptides were identified resulting in 22 different putative proteins. The identified proteins were classified into 8 groups according to biological process and most of them were clustered into a cellular metabolic process category. These results generated a collection of proteins that could contribute to the understanding of many biological processes of *P. serpens*.

Keywords: *Phytomonas serpens*, proteome, *Trypanosoma cruzi*, immunological cross-reactivity.

1. Introduction

The family Trypanosomatidae comprises flagellated protozoa that have been classified, depending on the host range, as either monoxenous microorganisms including *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* and *Rhynchoidomonas* or heteroxenous microorganisms including *Endotrypanum*, *Leishmania*, *Phytomonas* and *Trypanosoma* (Vickerman, 1976).

Some species of the family Trypanosomatidae are responsible for diseases that affect humans and animals (*Leishmania* and *Trypanosoma*) and plants (*Phytomonas*). *Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas' disease (Chagas, 1909), an illness that affects millions of people, particularly in Latin America (WHO, 2002). There is no vaccine against infection by *T. cruzi* and chemotherapy remains the only means of treatment for Chagas' disease. Meanwhile the drugs available are few and efficacy is limited mainly due to the development of resistance or lack specificity (Filardi and Brener, 1987). Despite this scenario, efforts directed at the discovery of new antitrypanosomal agents and/or vaccines are insufficient (Tarleton et al., 2007).

Species of the genus *Phytomonas* alternate their biological cycle between phytophagous insects of the order Hemiptera and many types of plants (Jankevicius et al., 1989; Batistoti et al., 2001). Promastigote forms of the parasite colonize the digestive tract of these insects, cross the intestinal barrier and reach the salivary glands through the hemolymph. These microorganisms are transmitted by the host through the saliva when feeding. In the plant, promastigote forms, and rarely amastigote forms, are found in the phloem, lactiferous tubes, fruits or seeds (Jankevicius et al., 1989). However, only the trypanosomatids found in the phloem of some economically important plants cause fatal phytopathological conditions (Camargo, 1999).

One of the first lines of evidence of antigenic cross-reactivity between species of trypanosomatids was reported by Noguchi (1926) when utilizing serologic tests to differentiate trypanosomatids of insects of the genus *Herpetomonas* from various species of *Leishmania*. Since then, several studies have demonstrated immunologic cross-reactivity between *T. cruzi* and monoxenous species of the family Trypanosomatidae. One approach largely used in those studies was the utilization of sera from chagasic patients to detect common antigens between these trypanosomatids (Lopes et al., 1981; Monteón et al., 1997).

Recently, it has been demonstrated that polyclonal antibodies against cruzipain, the main cysteine peptidase from *T. cruzi*, recognize two peptides of 38 and 40 kDa in *P. serpens*. The 40 kDa protein is located on the cell surface, and both have cysteine peptidase proteolytic activity and other similar features of cruzipain (Santos et al., 2006; 2007).

Previous works of our research group have also demonstrated that *P. serpens* 15T shares antigens with *T. cruzi*. We have demonstrated that sera from patients with Chagas' disease display a strong reactivity with *P. serpens* antigens by indirect immunofluorescence (IIF) assay. In addition, when the sera of Chagas' disease patients were adsorbed with *P. serpens* 15T promastigotes, a significant reduction in IIF titers to *T. cruzi* antigens was observed. It was also observed that there was partial protection against infection of BALB/c mice immunized with *P. serpens* by the oral route and later challenged with a lethal inoculum of blood trypomastigotes of *T. cruzi*. Infected and previously immunized mice showed a reduction in blood trypomastigote counts and in mortality compared to non-immunized animals (Breganó et al., 2003). The protection afforded by *P. serpens* immunization is due to nitric oxide production, as observed from the higher parasitemia and mortality of iNOS deficient mice when compared to wild-type C57BL/6 mice. Moreover, immunized and infected wild-type mice showed fewer amastigote nests in their heart, although immunization with *P. serpens* did not induce inflammation in the myocardium (Pinge-Filho et al., 2005). In

view of these results, a proteomic study was carried out to identify proteins of *P. serpens* 15T that are recognized by sera from patients with Chagas' disease.

2. Material and methods

2.1. Microorganism

P. serpens 15T was isolated from *Solanum lycopersicum* in Londrina, Paraná, Brazil. Promastigote forms of the flagellate were maintained at 28 °C in GYPMI medium (Jankevicius et al., 1989).

2.2. Protein solubilization

Aliquots of 2×10^8 log-phase promastigotes of *P. serpens* were harvested by centrifugation at 2000 x g for 10 min at 4 °C and washed three times in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2. Total protein extracts were obtained by lysing the flagellates in a buffer containing 40 mM Tris base, 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS and 1 mM TLCK (Sigma-Aldrich Co, São Paulo, Brazil). After 30 min incubation at room temperature with gentle agitation, lysed flagellates were centrifuged for 30 min at 13,000 x g and the supernatant was kept at - 80 °C. The protein concentration was determined using the Bradford reagent, and the proteins were loaded for isoelectric focusing (IEF).

2.3. 2D electrophoresis

For the first dimension, aliquots of solubilized proteins (500 µg) were diluted to a final volume of 250 µl in rehydration solution (8 M urea, 2% CHAPS, 40 mM DTT, 0.5%

ampholytes 3-10, 0.002% bromophenol blue). This solution was applied to 13-cm IPG-strips (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) with a non linear separation range of gradient pH 3-10 by in-gel rehydration. After 10 h of rehydration at 20 °C, IEF was performed on an Ethan™ IPGphor™ unit (Amersham Biosciences), at the same temperature, with the following conditions: 500 V for 1 h, 1000 V for 1 h, 4000 V for 1 h, 6000 V for 2 h, 8000 V for 9 h and 100 V for 1h. Before second dimension electrophoresis, proteins were reduced and alkylated by incubation of the strips as follow: 15 min in equilibration buffer (6 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 30% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue) containing 5 mg/ml DTT, and for an additional 15 min in the same buffer containing 12.5 mg/ml iodoacetamide instead of DTT. Equilibrated IPGphor strips were separated across 12.5% SDS-PAGE gels, using a vertical system (Hoefer™ SE 600 Ruby™, Amersham Biosciences), at 30 mA/gel constant current at 10 °C until the dye front reached the lower end of the gel. Proteins were visualized by silver staining according to the following procedures: gels were fixed in 12% v/v acetic acid, 50% v/v ethanol and 0.5 ml/l formaldehyde (37% w/v) for 30 min. After 3 x washes (5, 10 and 15 min) in 50% v/v ethanol, the gels were incubated in 0.02% w/v sodium thiosulfate for 30 s followed by three 5-min washes in water. Another 30-min incubation was carried out in a solution containing 0.2% w/v silver nitrate and 0.75 ml/l formaldehyde. After 3 x washes in water, development was performed by incubation in a solution containing 3% w/v sodium carbonate, 2% w/v sodium thiosulfate and 0.5 ml/l formaldehyde. The reaction was stopped with 50% v/v ethanol and 12% v/v acetic acid.

2.4 Western blotting

Parasite protein extracts separated by electrophoresis, as above, were electrotransferred onto Hybond-C membranes (GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, Brazil) according to standard procedures (Towbin et al., 1979). The membranes were blocked

by incubation in 5% skim milk powder in TBS (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl) containing 0.05% Tween-20. The blots were probed using 1: 80 dilution of chagasic sera. Bound antibodies were detected with 1: 7,500 dilution of phosphatase alkaline-conjugated anti-human IgG (Promega, Wisconsin, USA) and developed with 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate and nitroblue tetrazolium.

2.5 Protein digestion and mass spectrometric analysis

Each protein spot that was recognized by sera from Chagas' disease patients was manually excised from the gel and destained for 15 min with a freshly prepared solution of 30 mM potassium ferricyanide, 100 mM sodium thiosulfate. After several washes in water, the gel pieces were further washed 2 x 30 min in 0.1 M ammonium bicarbonate, pH 8.3, 50% v/v acetonitrile solution. The gels were dried using a Savant Speed Vac® evaporator (TeleChem International, Inc. Sunnyvale, USA) and were rehydrated in 15 µL of 50 mM ammonium bicarbonate. The proteins were enzymatically digested overnight at 37 °C with sequencing grade porcine trypsin (0.5 µg/ml, Promega). The tryptic peptides were extracted twice with 40 µl of 60% v/v acetonitrile, 0.1% v/v TFA (trifluoroacetic acid) solution in a sonicator for 10 min. The extracts were concentrated under vacuum to an approximate volume of 10 µl. The resulting tryptic peptides were desalted on C8 cartridges (Michrom BioResources Inc., California, USA) and subjected to 2D Nano LC/MS/MS analyses on a Michrom BioResources Paradigm MS4 Multi-Dimensional Separations Module, a Michrom NanoTrap Platform and a LCQ Deca XP plus ion trap mass spectrometer. The mass spectrometer was operated in data-dependent mode and the four most abundant ions in each MS spectrum were selected and fragmented to produce tandem mass spectra. The MS/MS spectra were recorded in the profile mode.

2.6 Database search

Proteins were identified by searching the MS/MS spectra against the National Center for Biotechnology non-redundant and GeneDB databases, and its reverse complement using Bioworks v3.2. Peptide and protein hits were scored and ranked using the probability-based scoring algorithm incorporated in Bioworks v3.2 and adjusted to a false positive rate of < 1%. Only peptides identified as possessing fully tryptic termini with cross-correlation scores (Xcorr) greater than 1.9 for singly charged peptides, 2.3 for doubly charged peptides and 3.75 for triply charged peptides were used for peptide identification. In addition, the delta correlation scores (ΔCn) were required to be greater than 0.1, and for increased stringency, proteins were accepted only if their probability scored was <0.00001.

3. Results and discussion

3.1. 2D electrophoresis and Western blotting analyses

Proteins from whole-cell lysates of log-phase promastigotes of *P. serpens* 15T were separated by 2DE in pH range 3-10. Approximately 150 spots were detected in the silver-stained gels. There was homogeneous distribution of the peptides in relation to isoelectric focusing, but with the greatest concentration of peptides with an estimated molecular mass above 30 kDa (Figure 1A).

Several peptide spots reacted strongly with the sera from patients with Chagas' disease (Figure 1B), and most of them showed a molecular mass range of 25-100 kDa. Healthy human sera were also tested, and the result is shown in Figure 1C. A total of 31 tryptic peptide samples (shown in the Figure 1A and 1B) were analyzed by MS/MS.

3.2. Protein identification

Automatic search and blast searching allowed the identification of 28 spots, resulting in 22 different putative proteins (Table 1).

One limitation of this approach is that few genes of *Phytomonas* spp. have been sequenced and characterized at the moment. Pappas et al., (2005) generated expressed sequence tags (EST) from a cDNA library of *P. serpens* 10T. Most of the protein identified in our study matched with the deduced amino acid sequence from these ESTs, validating previous gene predictions. In some instances no homolog sequences were found in *Phytomonas* spp., and we assigned the protein identity by homology with other trypanosomatids.

The results of this analysis showed that two proteins, from spots 6 and 18, identified in this analysis are ortholog genes annotated as hypothetical in *T. brucei* and *T. cruzi* databases, respectively. Some proteins were detected in more than one spot: cystathionine beta synthase (4 and 27), fructose-bisphosphate aldolase (9 and 11) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (10 and 12), enolase (16 and 24), and malic enzyme (29, 30 and 31). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a glycosomal enzyme that has also been detected in the cytosol of trypanosomatids (Hannaert et al., 1998), which could explain the isoenzymes found in this study. *Phytomonas* sp. also contains two isoforms of malic enzyme, a mitochondrial isoenzyme with a high specificity for oxaloacetate and a glycosomal isoenzyme that acts on a broad range of substrates (Uttaro and Opperdoes, 1997). Two forms of malic enzyme have been demonstrated in *T. cruzi* as well. These isoenzymes showed the same molecular mass but different electrophoretic mobility and regulatory properties (Cannata et al., 1979). Probably, at least three isoforms of malic enzyme are expressed in *P. serpens* 15T, as indicated by their different isoelectric points. We also cannot exclude the possibility that some protein spots may have resulted from protein degradation.

3.3. Biological functions of the identified peptides

According to the gene ontology annotation of biological processes, the identified proteins of *P. serpens* 15T could be classified into 8 categories (Table 2), and most of them were clustered into a cellular metabolic process category. Because of the hydrophobic nature of membrane proteins, they are usually under-represented in proteomic analyses (Santoni et al., 2000). Indeed, in previous 2-D electrophoresis map of whole-cell lysates of *T. cruzi* (Paba et al., 2004; Parodi-Talice et al., 2004) and *Leishmania braziliensis* (Cuervo et al., 2007), membrane proteins were not identified. This could explain why the sera of Chagas' disease patients did not recognize membrane proteins of *P. serpens* in this study.

Of the 22 proteins identified, 7 (31.8%) were associated with carbohydrate metabolism. In *Phytomonas* spp., glucose, fructose and mannose serve as the main energy substrates (Sanchez-Moreno et al., 1992; Chaumont et al., 1994) which are taken up mainly by transport processes (Canepa et al., 2007). Like other trypanosomatids, species of *Phytomonas* degrade carbohydrates via glycolysis, and the first reactions of the classical Embden-Meyerhof pathway occur inside glycosomes (Sanchez-Moreno et al., 1992). Since *Phytomonas* sp. lack a functional citric acid cycle (Sanchez-Moreno et al., 1992; Chaumont et al., 1994) and since genes for cytochrome mediated respiration are missing in the maxicircle kinetoplast DNA from *P. serpens* (Maslov et al., 1999; Nawathean and Maslov, 2000), they depend on glycolysis to obtain energy. The major end-products of carbohydrate degradation are acetate and ethanol, which are produced by acetate:succinate CoA-transferase and alcohol dehydrogenase, respectively (Sanchez-Moreno et al., 1992). Three enzymes of the glycolytic pathway were identified in this study, fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and cytosolic enolase. We also identified one peptide as isocitrate dehydrogenase and three as mitochondrial malic enzyme.

Enzymes from the glycolytic pathway have been selected as targets for drugs against members of Trypanosomatidae family, including fructose-bisphosphate aldolase (Dax et al., 2006) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (de Marchi et al., 2004). The same approach has been used for sterol biosynthesis since trypanosomatids synthesize ergosterol and related 24-alkylated sterols, whose structure and biosynthetic pathway show differences compared to that for cholesterol found in mammalian cells. One principal difference is the reaction catalyzed by S adenosyl-L-methionine C24-delta sterol methyltransferase, which introduces a C24-methyl group to the ergosterol and stigmasterol side chains (Roberts et al., 2003). Inhibitors of this enzyme have been shown to have antiproliferative effects in several trypanosomatids (Lorente et al., 2004).

Another potential target for the development of new drugs in the treatment of diseases caused by trypanosomatids is the metabolic pathway of sulfur-containing amino acids. The cystathionine beta synthase catalyzes the *trans*-sulfuration reaction of homocysteine to cysteine, a sulfur-containing amino acid that plays an important role in the structure, stability and catalytic functions of many proteins. *T. cruzi* cystathionine beta synthase differs from the corresponding mammalian enzymes. The parasite enzyme lacks the 90-120 amino acids in the carboxyl terminal, is not activated by the presence of S-adenosylmethionine, and does not contain heme (Nozaki et al., 2001).

Protein synthesis represented the second most abundant category, where 6 (27.3%) different proteins were identified. Of particular interest is a small phosphorylated protein located at the ribosome “stalk,” the 60S acidic ribosomal protein P. The biological function of eukaryotic P proteins is still unclear. Their participation in protein synthesis has been shown, and besides, these proteins may also be involved in transcription and DNA repair processes. In addition, P proteins have been implicated in several diseases associated with the immune

response, including systemic lupus erythematosus, allergies caused by some filamentous fungi and protozoan infections (Tchórzewski, 2002).

Antibodies to ribosomal P proteins are prevalent in patients with chronic Chagas heart disease and they are directed against the carboxy-terminal region of the *T. cruzi* proteins (Levin et al., 1989). These antibodies were able to cross-react with the acidic motif present on the second extracellular loop of human cardiac β 1 adrenergic receptor (Lopez-Bergami et al., 2005; Smulski et al., 2006). Anti-P antibodies are believed to take part in the induction of heart dysfunctions, such as arrhythmias and/or other electrical disorders (Lopez-Bergami et al., 2001). Corroborating this, mice immunized with the recombinant *T. cruzi* P protein (TcP2 β) demonstrated a strong response against the C-terminal region of this protein and developed lethal supraventricular tachycardia (Lopez-Bergami et al., 1997). As mentioned, mice previously immunized with live *P. serpens* 15T and infected with *T. cruzi* did not display inflammation in the myocardium (Pinge-Filho et al., 2005). Altogether, these data open perspectives for exploring the role of the 60S acidic ribosomal protein P from *P. serpens* in the protection against *T. cruzi* infection.

The other proteins assigned in this study are associated with various activities. A protein involved in proteolytic activity, the proteasome alpha 2 subunit, was identified in this study. Proteasomes are multicatalytic protein complexes that exist universally among eukaryotes and play an important role in intracellular protein degradation, regulating the cell cycle and antigen presentation. De Diego et al., (2001) have reported that the ubiquitin-proteasome pathway has an essential role in protein turnover during *T. cruzi* differentiation. Calmodulin, a universal Ca²⁺-binding protein, can modulate the activity of other proteins. In *T. cruzi*, this protein has been shown to have a role in cell differentiation (Lammel et al., 1996) and motility (Ridgley et al., 2000). Finally, one peptide was identified as a GTP-binding rtb2 protein by homology with the ortholog protein in *T. brucei*. In this parasite, the

protein has homology to Ran, a member of G protein superfamily, which is an essential element in the transport of proteins and RNA across the nuclear membrane (Field et al., 1995). Finally, one peptide was identified as a mucin-like protein. Now, we are faced with the task of trying to understand the significance of these proteins in *P. serpens* biology and *T. cruzi* cross-reactivity.

Promastigote forms of *P. serpens* are easily cultivated in *in vitro* conditions at 28 °C, but not at 37 °C (Catarino et al., 2001). They are highly immunogenic. Additionally, the antigenic and metabolic pathway similarities between *P. serpens* and *T. cruzi* raise important questions about 1) obtaining and utilizing antigens from microorganisms that are innocuous to humans for immunologic diagnosis of Chagas' disease, as well as for the development of new strategies of immunization against infection by *T. cruzi*, and 2) studying target molecules for the development of new chemotherapeutic agents against trypanosomatids.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária -Paraná and Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação (PROPPG) of Universidade Estadual de Londrina (UEL). This work was part of the Ph.D. dissertation of V.K. Graça-de Souza. We thank Dr. A. Leyva for English editing of the manuscript and Ediel Clementino da Costa for technical support.

References

Batistoti, M., Cavazzana, M.Jr., Serrano, M.G., Ogatta, S.F., Baccan, G.C., Jankevicius, J.V., Teixeira, M.M. and Jankevicius, S.I.; 2001. Genetic variability of trypanosomatids isolated from phytophagous hemiptera defined by morphological, biochemical, and molecular taxonomic markers. *J. Parasitol.* 87, 1335-1341.

Breganó, J.W., Picão, R.C., Graça, V.K., Menolli, R.A., Itow-Jankevicius, S., Pinge-Filho, P. and Jankevicius, J.V.; 2003. *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. 39, 257-264.

Canepa, G.E., Carrillo, C., Armesto, A.R., Bouvier, L.A., Miranda, M.R. and Pereira, C.A.; 2007. *Phytomonas*: transport of amino acids, hexoses and polyamines. Exp. Parasitol. 117, 106-110.

Cannata, J.J., Frasch, A.C., Cataldi de Flombaum, M.A., Segura, E.L. and Cazzulo, J.J.; 1979. Two forms of 'malic' enzyme with different regulatory properties in *Trypanosoma cruzi*. Biochem. J. 184, 409-419.

Catarino, L.M., Serrano, M.G., Cavazzana, M.Jr., Almeida, M.L., Kaneshima, E.K., Campaner, M., Jankevicius, J.V., Teixeira, M.M. and Itow-Jankevicius, S.; 2001. Classification of trypanosomatids from fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates. FEMS Microbiol. Lett. 201, 65-72.

Chagas, C.; 1909. Nova tripanosomiase humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida no homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1, 159-218.

Chaumont, F., Schanck, A.N., Blum, J.J. and Opperdoes, F.R.; 1994. Aerobic and anaerobic glucose metabolism of *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. Mol. Biochem. Parasitol. 67, 321-331.

Cuervo, P., de Jesus, J.B., Junqueira, M., Mendonça-Lima, L., González, L.J., Betancourt, L., Grimaldi, G.Jr., Domont, G.B., Fernandes, O. and Cupolillo, E.; 2007. Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Mol. Biochem. Parasitol. 154, 6-21.

Dax, C., Duffieux, F., Chabot, N., Coincon, M., Sygusch, J., Michels, P.A. and Blonski, C.; 2006. Selective irreversible inhibition of fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Trypanosoma brucei*. *J. Med. Chem.* 49, 1499-1502.

de Diego J.L., Katz, J.M., Marshall, P., Gutiérrez, B., Manning, J.E., Nussenzweig, V. and González, J.; 2001. The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. *Biochemistry* 40, 1053-1062.

de Marchi, A.A., Castilho, M.S., Nascimento, P.G.B., Archanjo, F.C., Del Ponte, G., Oliva, G. and Pupo, M.T.; 2004. New 3-piperonylcoumarins as inhibitors of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 4823–4833.

de Souza, M. de S., Mizuta, K. and Ikemoto, H.; 1980. In vitro exoantigen from *Herpetomonas samuelpessoai* which protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 22, 184-191.

Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong S.F. and Whitehouse, C.M.; 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71.

Field, M.C., Field, H. and Boothroyd, J.C.; 1995. A homologue of the nuclear GTPase ran/TC4 from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 69, 131-134.

Filardi, L.S. and Brener, Z.; 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc Trop. Med. Hyg.* 81, 755-759.

Hannaert, V., Opperdoes, F.R. and Michels, P.A.M.; 1998. Comparison and evolutionary analysis of the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from different Kinetoplastidae. *J. Mol. Evol.* 47, 728-738.

- Jankevicius, J.V., Itow-Jankevicius, S., Campaner, M., Conchon, I., Maeda, L., Teixeira, M.M.G., Freymuller, E. and Camargo, E.P.; 1989. The life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes. *J. Protozool.* 36, 265-271.
- Lammel, E.M., Barbieri, M.A., Wilkowsky, S.E., Bertini, F. and Isola, E.L.; 1996. *Trypanosoma cruzi*: involvement of intracellular calcium in multiplication and differentiation. *Exp. Parasitol.* 83, 240-249.
- Levin, M.J., Mesri, E., Benarous, R., Levitus, G., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Chiale, P.A., Ruiz, A.M., Kahn, A., Rosenbaum, M.B., Torres, H.N. and Segura, E.L.; 1989. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41, 530-538.
- Lopes, J.D., Caulada, Z., Barbieri, C.L. and Camargo, E.P.; 1981. Cross-reactivity between *Trypanosoma cruzi* and insect trypanosomatids as a basis for the diagnosis of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 1183-1188.
- Lopez Bergami, P., Cabeza Meckert, P., Kaplan, D., Levitus, G., Elias, F., Quintana, F., Van Regenmortel, M., Laguens, R. and Levin, M.J.; 1997. Immunization with recombinant *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2beta protein induces changes in the electrocardiogram of immunized mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 18, 75-85.
- Lopez Bergami, P., Scaglione, J. and Levin, M.J.; 2001. Antibodies against the carboxyl-terminal end of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins are pathogenic. *FASEB J.* 15, 2602-2612.
- Lopez Bergami, P., Gómez, K.A., Levy, G.V., Grippo, V., Baldi, A. and Levin, M.J.; 2005. The β_1 adrenergic effects of antibodies against the C-terminal end of the ribosomal P2 β protein of *Trypanosoma cruzi* associate with a specific pattern of epitope recognition. *Clin. Exp. Immunol.* 142, 140-147.

Lorente, S.O., Rodrigues, J.C., Jiménez Jiménez, C., Joyce-Menekse, M., Rodrigues, C., Croft, S.L., Yardley, V., De Luca-Fradley, K., Ruiz-Pérez, L.M., Urbina, J., de Souza, W., González Pacanowska, D. and Gilbert, I.H.; 2004. Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2937–2950.

Maslov, D.A., Nawathean, P. and Scheel, J.; 1999. Partial kinetoplast-mitochondrial gene organization and expression in the respiratory deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99, 207-221.

Monteón, V.M., Guzmán-Rojas, L., Negrete-García, C., Rosales-Encina, J.L. and Lopes, P.A.; 1997. Serodiagnosis of American trypanosomiasis by using nonpathogenic trypanosomatid antigen. *J. Clin. Microbiol.* 35, 3316-3319.

Nawathean, P. and Maslov, D.A.; 2000. The absence of genes for cytochrome c oxidase and reductase subunits in maxicircle kinetoplast DNA of the respiration-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Curr. Genet.* 38, 95-103.

Noguchi, H.; 1926. Comparative studies of Herpetomonads and Leishmanias. Differentiation of the organisms by serological reactions and fermentation tests. *J. Exp. Med.* 44, 327-337.

Nozaki, T., Shigeta, Y., Saito-Nakano, Y., Imada, M. and Kruger, W.D.; 2001. Characterization of transsulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*. Isolation and molecular characterization of cystathionine β -synthase and serine acetyltransferase from *Trypanosoma*. *J. Biol. Chem.* 276, 6516–6523.

Pappas, G.J.Jr, Benabdellah, K., Zingales, B. and González, A.; 2005. Expressed sequence tags from the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 142, 149-157.

- Paba, J., Santana, J.M., Teixeira, A.R.L., Fontes, W., Sousa, M.V. and Ricart, C.A.O.; 2004. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics* 4, 1-8.
- Parodi-Talice, A., Durán, R., Arrambide, N., Prieto, V., Piñeyro, M.D., Pritsch, O., Cayota, A., Cerveñansky, C. and Robello, C.; 2004. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* 34, 881-886.
- Pinge-Filho, P., Peron, J.P.S., de Moura, T.R., Menolli, R.A., Graça, V.K., Estevão, D., Tadokoro, C.E., Jankevicius, J.V. and Rizzo, L.V.; 2005. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide. *Immunol. Lett.* 96, 283-290.
- Ridgley, E., Webster, P., Patton, C. and Ruben, L.; 2000. Calmodulin-binding properties of the paraflagellar rod complex from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 109, 195-201.
- Roberts, C.W., McLeod, R., Rice, D.W., Ginger, M., Chance, M.L. and Goad, L.J.; 2003. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126, 129-142.
- Sanchez-Moreno, M., Lasztity, D., Coppens, I. and Opperdoes, F.R.; 1992. Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54, 185-200.
- Santoni, V., Kieffer, S., Desclaux, D., Masson, F. and Rabilloud, T.; 2000. Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis* 21, 3329-3344.
- Santos, A.L.S., D'Avila-Levy, C.M., Dias, F.A., Ribeiro, R.O., Pereira, F.M., Elias, C.G.R., Souto-Padrón, T., Lopes, A.H.C.S., Alviano, C.S., Branquinha, M.H. and Soares, R.M.A.;

2006. *Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion. *Int. J. Parasitol.* 36, 47-56.

Santos, A.L.S., D'Avila-Levy, C.M., Elias, C.G., Vermelho, A.B. and Branquinha, M.H.; 2007. *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. *Microbes Infect.* 9, 915-921.

Smulski, C., Labovsky, V., Levy, G., Hontebeyrie, M., Hoebeke, J. and Levin, M.J.; 2006. Structural basis of the cross-reaction between an antibody to the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2 β protein and the human β 1 adrenergic receptor. *FASEB J.* 20, 1396-1406.

Tarleton, R.L., Reithinger, R., Urbina, J.A., Kitron, U. and Gürtler, R.E.; 2007. The challenges of Chagas Disease – grim outlook or glimmer of hope. *Plos Med.* 4, 1852-1857.

Tchórzewski, M.; 2002. The acidic ribosomal P proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 911–915.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.; 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.

Uttaro, A.D. and Opperdoes, F.R.; 1997. Characterisation of two malate dehydrogenases from *Phytomonas* sp. Purification of the glycosomal isoenzyme. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89, 51-59.

Vickerman, K.; 1976. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: W.H.R. Lumsden and D.A. Evans (Eds.), *Biology of the Kinetoplastida*, London, Academic Press, pp. 1-34.

WHO - World Health Organization; 2002. Control of Chagas disease. *Tech. Rep. Ser.* 905, 1-109.

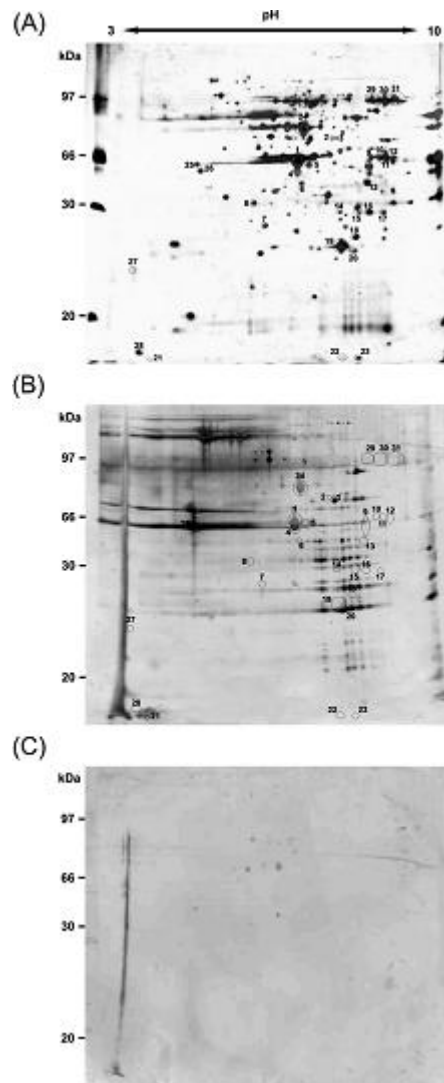


Figure 1. (A) A two-dimensional (2-D) electrophoresis of *P. serpens* 15T. Promastigotes forms of *P. serpens* were lysed in a buffer containing 40 mM Tris base, 7 M urea, 4% CHAPS, 2 M thiourea and 1 mM TLCK. Lysed parasites were centrifugated for 30 minutes at 13,000 x g and the supernatant (500 μ g) was used for isoelectric focusing (IEF) and proteins were separated over a non linear pH gradients 3-10 immobilized (IPG) strips in Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System. The second dimension was realized in 12.5% SDS-PAGE and the proteins were detected by silver staining. The scale at the top indicates the pH range of the first dimension IPG strip from which the apparent isoelectric points (pI) of the separated proteins can be estimated. At the left side, the molecular weight standard is showed in kDa. The numbers indicate the selected spots for mass spectrometry analysis. (B) Western blot analysis of *P. serpens* 15T total proteins. After the 2-D electrophoresis the proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membranes following standard procedures and the blots were assayed with serum of patients with Chagas disease. The bound proteins were detected with conjugated alkaline phosphatase anti- human IgG. At the left side, the molecular weight standard is showed in kDa. (C) Western blot analysis of *P. serpens* 15T total proteins using serum from non-chagasic patients. The assay was carried out in the same conditions in (B). At the left side, the molecular weight standard is showed in kDa.

Table 1: *P. serpens* 15T proteins identified by MS/MS peptide mass fingerprinting.

Spot	Accession number	Protein name ^a	Organism	Peptide sequence ^b	P value
1	XP_821876 CO723781	Alcohol dehydrogenase	<i>T. cruzi</i>	R.TATKEDVMQIFR.N	3.80 e ⁻¹⁸
2	XP_847200 CO724325	Isocitrate dehydrogenase mitochondrial	<i>T. brucei</i>	R.HAYGDQYAATDSK.F	9.30 e ⁻⁰⁴
3	CAJ05698	2-Oxoglutarate dehydrogenase	<i>L. major</i>	K.LGLMSPFVK.A	4.35 e ⁻⁰⁵
4	XP_812998 CO723809	Cystathionine beta synthase	<i>T. cruzi</i>	R.VGKNMVLTAEAEGR.L	2.65 e ⁻⁰⁶
5	XP_001568880	Sterol C24-delta methyltransferase	<i>L. braziliensis</i>	R.YAQESFYESIMR.H	3.13 e ⁻⁰⁵
6	XP_001568630	Hypothetical protein	<i>L. braziliensis</i>	R.FTTGQSRLPLKTK.I	5.87 e ⁻⁰³
7	XP_816099 CO723969	60S ribosomal protein L7	<i>T. cruzi</i>	R.QAATAGNYYLEAKPK.V	2.73 e ⁻⁰⁷
8	XP_809696 CO723819	40S ribosomal protein S4	<i>T. cruzi</i>	R.LKDAAGNEFATR.A	1.92 e ⁻⁰⁸
9	P07752 CO723885	Fructose-biphosphate aldolase, glycosomal	<i>T. brucei</i>	R.GKGLLAADESTGSC*TK. R	3.78 e ⁻⁰⁶
10	ABW81352	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, glycosomal	<i>P. serpens</i>	K.KVVISAPSGGVK.T	2.58 e ⁻⁰⁴
11	P07752 CO723885	Fructose-biphosphate aldolase, glycosomal	<i>T. brucei</i>	K.YISGVILHDETVYQK.A	5.40 e ⁻⁰⁶
12	ABW81352	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, glycosomal	<i>P. serpens</i>	R.YDSVHGKPR.S	4.02 e ⁻⁰³
15	XP_810966 CO723939	60S Ribosomal protein L13	<i>T. cruzi</i>	R.KVTSEEQTKNVYK.F	1.98 e ⁻⁰⁴
16	AAD45340	Enolase	<i>T. cruzi</i>	K.SKLGANAILGC*SMAISK. A	1.74 e ⁻⁰⁸
17	XP_802422	40S ribosomal protein SA	<i>T. cruzi</i>	R.VIAAVENPQDVC*VC*SA R.L	4.88 e ⁻⁰⁶
18	XP_806271	Hypothetical protein	<i>T. cruzi</i>	R.LVQIEYATTAASK.G TCRUZI	3.81 e ⁻⁰⁵
19	XP_811505	Proteasome alpha 2 subunit	<i>T. cruzi</i>	R.GKIC*FNC*WDTAGQEK. F	2.02 e ⁻⁰⁶
20	XP_843706 CO724310	GTP-binding rtb2	<i>L. braziliensis</i>	R.VGALFTELEGKSFDELIC* MEGK.S	1.96 e ⁻⁰⁸
21	XP_001566999 CO723839	60S acidic ribosomal protein P2	<i>L. braziliensis</i>	R.VGALFTELEGKSFDELIC* MEGK.S	8.10 e ⁻¹⁰
23	P27795 CO723840	Histone H2B	<i>T. cruzi</i>	K.IVNSFVNDIFER.I	5.44 e ⁻⁰⁶
24	XP_819700	Enolase	<i>T. cruzi</i>	K.SKLGANAILGC*SMAISK. A	1.21 e ⁻⁰⁹
25	XP_821118 CO723812	60S ribosomal protein PO	<i>T. cruzi</i>	K.KVLSAGDRVDNSTATLL QK.L	4.04 e ⁻⁰⁴
26	XP_813392	25 kDa Translation elongation factor 1-beta	<i>T. cruzi</i>	R.DGLLWGDHK.L	6.87 e ⁻⁰⁵
27	AAK16402 CO723809	Cystathionine beta synthase	<i>T. cruzi</i>		2.71 e ⁻¹⁰
28	XP_808090 CO724395 DQ503481	Calmodulin	<i>T. cruzi</i>	R.VFDKDGNGFISAAELR.H	1.10 e ⁻¹⁰
29	XP_001565344 CO723957	Malic enzyme	<i>L. braziliensis</i>	R.KALGLEGLVLPNAVETLET QVKR.Y	3.39 e ⁻¹⁰
30	XP_814409 CO723957	Malic enzyme	<i>T. cruzi</i>	K.SSLYVAGAGLQPSR.V	4.55 e ⁻⁰⁶
31	XP_814409 CO723957	Malic enzyme	<i>T. cruzi</i>	R.FTNKGTAFMKER.K	5.23 e ⁻⁰⁸

^aNCBI database: Protein ID/*Phytomonas* spp similar nucleotide sequence. ^bUsing the SEQUEST algorithm and ProFit Protein software against the NCBI and GeneDB databases.

Table 2: Proteins identified by MS/MS with known function grouped into functional categories

Categories	Protein
Carbohydrate metabolism	Alcohol dehydrogenase Enolase Fructose-biphosphate aldolase, glycosomal Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, glycosomal Isocitrate dehydrogenase, mitochondrial Malic enzyme 2-Oxoglutarate dehydrogenase
Protein synthesis	60S ribosomal protein L13 60S ribosomal protein L7 60S acidic ribosomal protein P2 60S ribosomal protein P0 40S ribosomal protein S4 40S ribosomal protein SA 25 kDa translation elongation factor 1-beta
Amino acid metabolism	Cystathionine beta synthase
Lipid metabolism	Sterol C24-delta methyltransferase
Nucleosome assembly	Histone H2B
Proteolysis	Proteasome alfa 2 subunit
Endomembrane system	Calmodulin
Intracellular protein/RNA transport	GTP-binding rtb2

CONCLUSÕES GERAIS

5.1. A análise proteômica de *P. serpens* utilizando a eletroforese bi-dimensional e em seguida a seleção dessas proteínas com soro de pacientes com doença de Chagas confirmou a existência de reatividade antigênica cruzada entre *P. serpens* e *T. cruzi*, dois protozoários pertencentes à Família Trypanosomatidae. A análise posterior por espectrometria de massa em tandem mostrou que são proteínas de vias metabólicas, proteínas estruturais, de síntese e outras. A reatividade antigênica bem como a existência de vias metabólicas em comum entre tripanossomatídeos e principalmente entre membros distantes da família Trypanosomatidae como *P. serpens* um parasita do tomate e *T. cruzi*, apresenta inúmeros interesses práticos. Primeiramente, esses parasitas de vegetais são inócuos ao homem, pois não se desenvolvem à 37⁰C, são lisados pelo sistema complemento além de serem mantidos facilmente em cultura axênica e são capazes de induzirem uma resposta imunológica em hospedeiros vertebrados. Portanto, todas essas evidências abrem perspectivas para a obtenção e utilização de antígenos de *P. serpens* para o diagnóstico imunológico da doença de Chagas; o desenvolvimento de novas estratégias de imunizações contra a infecção por *T. cruzi*; o desenvolvimento de moléculas alvo para o desenvolvimento de novos quimioterápicos na doença de Chagas. Além disso, a caracterização de genes de *P. serpens* pode fornecer subsídios para um melhor entendimento da biologia e fisiologia deste tripanossomatídeo.

5.2. A avaliação do extrato etanólico de *Erythrina speciosa* (Et-Es) revelou que a atividade antimicrobiana observada *in vitro* de Et-Es sobre formas epimastigotas não está envolvida no controle da infecção por *T. cruzi*. Além disso, o tratamento de camundongos infectados com Et-Es não modificou o quadro anêmico e não alterou a produção de NO por macrófagos. Assim, a determinação da atividade anti epimastigotas *in vitro* não é um critério suficiente para a seleção de plantas medicinais com potencial atividade anti *T. cruzi*.