



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAFAEL ANDRADE MENOLLI

**FATORES QUE INTERFEREM NA REAÇÃO IMUNE
CRUZADA ENTRE *Phytomonas serpens* e *Trypanosoma cruzi***

Londrina - Paraná

2004

RAFAEL ANDRADE MENOLLI

**FATORES QUE INTERFEREM NA REAÇÃO IMUNE
CRUZADA ENTRE *Phytomonas serpens* e *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Vitor Jankevicius

Londrina

2004

RAFAEL ANDRADE MENOLLI

FATORES QUE INTERFEREM NA REAÇÃO IMUNE CRUZADA
ENTRE *Phytomonas serpens* e *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. D. José Vitor Jankevicius

COMISSÃO EXAMINADORA

Londrina, 17 de dezembro de 2004.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Alcides e Maria Luzinete, que sempre me deixaram trilhar por onde minhas pernas me levassem e permitiram que pudesse fazer da minha vida a minha propria vida.
Aos meus irmãos , Gisele, André e Rodolfo, mais que irmãos, verdadeiros amigos e exemplo de filhos .

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Vitor Jankevicius, pela orientação, pela amizade, pelos conhecimentos transmitidos e pelo exemplo de dedicação e paciência.

À Profa Dra. Shinduca Itow Jankevicius, pela oportunidade, no laboratório, por seu exemplo como pesquisadora e pelo aprendizado oferecido.

Ao Prof. Dr. Phileno Pinge Filho, pelo exemplo de vontade e dedicação a pesquisa, pela amizade e pelo grande auxílio neste trabalho.

À Poli, pelo companheirismo e carinho demonstrado mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos do laboratório 5 do NIP: Viviane, Tatiane, Alberto, Gisele, Adriane, Érik, Daniele, Custódio, Eloisa e em especial o Ediel, grande amigo e palmeirense, pela conveniência harmoniosa e muito proveitosa.

Aos meus amigos do laboratório 3 de Imunologia Fausto, Ivo, Renata, Vera e Cidinha, por toda amizade e ajuda que demonstraram.

Aos colegas do curso, pela conveniência companheirismo e apoio.

E em especial agradeço:

À Deus, fonte de toda força e vontade que me fizeram chegar aqui.

Aos meus pais, pelo provimento de tudo aquilo que estava em suas mãos para fazerem de mim uma pessoa digna.

Aos meus irmãos, que sempre estiveram juntos nesta caminhada, nunca me deixando abater.

“A ciência? Ao fim e ao cabo, o que é ela senão uma longa e sistemática curiosidade?”

André Maurus(1885-1967), ensaísta francês

MENOLLI, Rafael Andrade. **Fatores que interferem na reação imune cruzada entre *Phytomonas serpens* e *Trypanosoma cruzi***. 2004. 63f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

RESUMO

A reação imune cruzada entre *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da Doença de Chagas e *Phytomonas serpens*, um tripanosomatídeo parasita de tomates pode ser usado com o propósito de diagnóstico e imunoproteção em modelos murinos experimentais. *Phytomonas serpens* pode ser encontrado em diversas linhagens, cultivado de frutos de tomates infectados de vários lugares e tempos, todos com forte reação imune cruzada na sua superfície com soros de pacientes chagásicos humanos. Duas linhagens, 9T, espécie de referência para *P. serpens*, e 15T, utilizada para estudos imunológicos, foram comparadas em experimentos de imunizações em camundongos e ambas mostraram uma significativa redução na parasitemia de um desafio letal de *T. cruzi*, mas somente a linhagem 15T prolongou a sobrevivência. Utilizando as linhagens de camundongos BALB/c e Swiss, geneticamente sensíveis à infecção com *T. cruzi*, uma redução da parasitemia e um pequeno aumento da sobrevivência foi obtido com a imunização com a linhagem 15T de *P. serpens*, enquanto com a linhagem de camundongos C57BL/6, geneticamente resistente à infecção pelo *T. cruzi*, não somente a parasitemia praticamente desapareceu como a sobrevivência foi acompanhada por meses. Estes resultados corroboram a participação de aspectos genéticos da parasita e do hospedeiro. Várias moléculas detectadas pelo Western blot não foram reconhecidas por todos os soros humanos de pacientes chagásicos e portadores de leishmaniose assim como soros humanos normais, indicando a variabilidade no reconhecimento imune entre os indivíduos. Estes dados denotam que a reação imune cruzada é um problema complexo, com resultados dependendo de características do hospedeiro e do parasita.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Imunidade de Mucosas	8
1.2 Família Trypanosomatidae	12
1.3 O Gênero <i>Phytomonas</i>	14
1.4 Doença de Chagas e o <i>Trypanosoma Cruzi</i>	19
1.5 Relações Antigênicas e Sorodiagnóstico da Doença de Chagas	23
2. REFERÊNCIAS	29
3. ARTIGO: <i>Phytomonas serpens</i> , a tomato parasite, shares antigens with <i>Trypanosoma cruzi</i> that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. Breganó, J.W.; Picão, R.C.; Graça, V.K.; Menolli, R.A.; Itow Jankevicius, S.; Pinge Filho, P.; Jankevicius, J.V. <i>FEMS Immunology and Medical Microbiology</i> . 2003	39
4. ARTIGO: Host and parasite factors influencing the immune cross-reactions between <i>Phytomonas serpens</i> and <i>Trypanosoma cruzi</i> . Rafael Andrade Menolli, Viviane Krominski Graça, José Wander Breganó, Alberto Durán González, Gisele dos Santos Carvalho, Jean Pierre S. Peron, Phileo Pinge Filho, Shiduca Itow Jankevicius, José Vitor Jankevicius ...	39
5. DISCUSSÃO FINAL	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 Imunidade de Mucosas

As superfícies mucosas são o maior contato com o ambiente e maior responsável, num ser humano saudável, pela resposta imune diária contra imunógenos. É na mucosa intestinal, mais especificamente na lâmina própria do intestino, que oitenta por cento dos imunócitos produtores de anticorpos estão localizados (TELEMO *et al*, 2003).

A anatomia imune das mucosas é composta pelos tecidos linfóides associados à mucosa (MALT), que incluem tecidos linfóides organizados como o tecido linfóide associada ao intestino (GALT) ou aos brônquios (BALT) responsáveis pela geração da maior quantidade diária de imunoglobulinas secretórias, do tipo IgA, lançadas na luz intestinal ou pulmonar. O GALT é composto por linfonodos agregados nas placas de Peyer (PP) e linfócitos isolados em contato direto com a lamina própria intestinal. As PP são cobertas por células epiteliais especializadas chamadas células M, que têm a capacidade de internalizar material antigênico, particularmente microorganismos íntegros que então são processados nas PP através de apresentação por células dendríticas (DC) ou macrófagos a linfócitos T que por sua vez migram para a área de linfócitos B para a produção de anticorpos (TELEMO *et al*, 2003). Estes linfócitos B estão comprometidos com a produção de IgA (McWILLIANS *et al*, 1977). Depois de ativados os linfócitos não só têm a capacidade de migrar para outros lugares da mucosa intestinal, mas também para outros tecidos linfóides sistêmicos e em mucosas (HOFT e EICKOFF, 2002). O principal interesse na mucosa intestinal é capacidade de imunização pela via oral, que tem atraído interesse principalmente pelas inúmeras oportunidades vindas da imunização oral, que teria uma vacinação facilitada pela via não invasiva e também a possibilidade de tratamento de doenças auto-imunes ou

hipersensibilidades através da tolerância desenvolvida a antígenos inoculados através desta via.

Antígenos administrados oralmente podem levar a diversos tipos de resposta, desde a tolerância, supressão e até imunidade ativa. A geração de resposta depende da função do antígeno, se será benéfico ou não ao organismo (MATZINGER, 2002).

A geração de resposta imune nas mucosas está intimamente ligada a diversos fatores tais como: natureza do antígeno, o sistema imune inato no local, o background genético e o estado imunológico do hospedeiro e o uso de adjuvantes (WEINER, 2000).

A grande maioria dos antígenos que adentram o organismo via mucosa oral são tolerizados, ie, o hospedeiro não desenvolve resposta imune específica. O desenvolvimento de tolerância à grande maioria dos imunógenos é responsável pelo não desenvolvimento de hipersensibilidade a antígenos do ar e da dieta, diariamente em contato conosco.

Os mecanismos que levam a essa tolerância são dependentes da dose do antígeno e envolvem deleção ou anergia de células T antígeno-específica e/ou geração de células T regulatórias produtoras ou não de citocinas imunossupressoras (IL-4, IL-10 e TGF- β) (WEINER, 1997; CHALLACOMBE e TOMASI, 1980).

Experimentos demonstrando o papel da dose do antígeno mostraram que uma imunização oral intensa e prolongada somente causa tolerização a um antígeno inoculado parenteralmente se esta imunização oral for iniciada pouco tempo antes da inoculação do antígeno intraperitonealmente (CONDE *et al*, 1998). A indução de tolerância em camundongos também mostrou que uma única dose com grande quantidade de antígeno pode ser mais efetiva do que diversas doses com pequena quantidade e que além de levar a uma tolerância, a imunização oral também poderia levar a uma estabilização do nível de anticorpos no sangue mesmo depois de seguidos reforços do antígeno, ie, a tolerância oral pode não ser só uma supressão da resposta imune a antígeno anteriormente expostos à via oral e

subseqüente imunização intaperitoneal, mas também tem a capacidade de estabilização do nível de anticorpos produzidos (VERDOLIN *et al*, 2001).

A dose também é importante na determinação do mecanismo de desenvolvimento de tolerância oral, pois uma dose baixa levaria a anergia clonal e deleção de linfócitos enquanto doses baixas levariam a indução de regulação celular ativa (WEINER, 2000).

Como a tolerância pode ser transferida através de soro e células de animais tolerizados é possível que anticorpos humorais (IgA?), antígenos circulantes não-degradados ou fragmentos tolerogênicos e citocinas possam atuar sinergicamente para conferir células T não-responsivas.

Independentemente dos mecanismos efetores envolvidos, uma questão maior que se apresenta é onde e como a tolerância é induzida, seja por supressão, anergia, deleção, ignorância e/ou desvio anatômico.

Muito pouco é sabido acerca dos mecanismos que governam a indução de tolerância de mucosa e especialmente as vias intracelulares de entrada de tolerógenos, a natureza das células apresentadoras de antígenos (APC's, antigen presenting cells) envolvidas, sua localização tecidual e as características das transduções de sinais das APC's para células T responsivas (CZERKINSKY *et al*, 1999).

A pesquisa em torno do aproveitamento da mucosa intestinal como geradora de resposta imune tem sido muito incisiva na busca de vacinas que possam ser inoculadas oralmente e terem efeitos sistêmicos, sendo aí importante a participação de adjuvantes para se tentar levar a um tipo de resposta desejável e eficiente contra infecções (ERIKSSON e HOLMGREN, 2002).

Uma dificuldade para se enfrentar é a capacidade das mucosas de desenvolver uma produção de imunidade local através da produção de IgA secretória mas paralelamente o

desenvolvimento de tolerância sistêmica, e neste processo poderiam estar envolvidas citocinas como IL-4 e TGF- β , que são responsáveis, por exemplo, pelo desenvolvimento de produção de IgA secretória local e tolerância periférica (HOLMGREN *et al*, 2003).

A busca de vacinas para infecções virais (LI *et al*, 2001; HAAN *et al*, 2001; KONG *et al*, 2001) e bacterianas (EVEREST *et al*, 1995; MUKHOPADHAYA, 2003) com a imunização pelas mucosas, com ou sem a ajuda de adjuvantes, tem tido avanços importantes, mas esbarra principalmente no desconhecimento dos mecanismos efetores de geração de imunidade ou tolerância proporcionada pelas mucosas.

A utilização de adjuvantes tem proporcionado um salto de qualidade nas proteções conferidas quando utilizada a imunização por via mucosa, uma vez que sua utilização proporciona um melhor ambiente ao antígeno escolhido, seja pela indução de um padrão de defesa mais específico ou como carregadora do antígeno até o local de ação mais propício, e esses papéis têm sido buscados com o uso desde produtos bacterianos já sabidamente adjuvantes de mucosas como toxina colérica e a enterotoxina colérica termo-lábil (PIZZA *et al*, 2001) até tentativas com sucesso de CpG DNA bacteriano (McCLUSKIE *et al*, 2000) e citocinas e quimiocinas (ARULANANDAM *et al*, 1999).

A pesquisa por vacinas de mucosas passa ainda na tentativa de alimentos transgênicos contendo antígenos, como por exemplo, batatas com o antígeno do vírus da hepatite B, que mostrou ser altamente imunogênica quando dada com uma dose subcutânea do mesmo antígeno com adjuvante (KONG, 2001). Outro exemplo nesta busca é uma vacina oral contra a tuberculose, o que facilitaria o acesso da população e poderia diminuir a incidência desta doença, que mostrou uma grande eficácia utilizando uma dose subcutânea para primar o sistema imune e reforçada com doses orais juntamente com um adjuvante, o que tem se mostrado quase que indispensável para uma imunização ideal por mucosa, diminuindo

satisfatoriamente a infecção dos pulmões de camundongos vacinados e infectados (DOHERTY *et al*, 2002).

Partículas semelhantes a vírus (VLP, vírus-like particles) têm sido utilizadas como uma forma de entrega de antígenos para aumentar a eficiência de uma possível vacinação pelas mucosas. VLP's da hepatite B (NIKURA *et al*, 2002) ou do papilovírus humano (SHI *et al*, 2001) em modelos experimentais demonstraram serem muito eficientes mesmo sem a ajuda de adjuvantes, o que torna essa alternativa também bastante interessante para aproveitamento comercial.

A capacidade de desenvolvimento de tolerância ou imunidade, de maneira detectável, junto à mucosa intestinal tem implicações importantes no cotidiano da ciência, pois se por um lado pode ser fonte de tratamento para doenças e aproveitamento de vacinas, pode também ter interferência no curso de infecções, através de reações imunológicas cruzadas entre microorganismos patógenos e outros pertencentes à nossa flora ou consumidos no dia a dia.

1.2 Família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae pertence à ordem Kinetoplastida, sendo constituída por um grupo de protozoários monoflagelados, todos parasitas, distribuídos em nove gêneros que são definidos de acordo com os estágios morfológicos que apresentam e o tipo de hospedeiro que parasitam. Os tripanosomatídeos podem ser encontrados em um grande número de hospedeiros vertebrados, invertebrados e vegetais (VICKERMAN, 1976).

Os gêneros *Leptomonas*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidia* e *Rhynchoidomonas* são constituídos por parasitas anteriormente denominados monoxênicos, exclusivos de insetos, mas infecções experimentais e isolamentos feitos em frutos permitiram

classificar como monoxênicos até o momento somente os gêneros *Blastocrithidia* e *Rhynchoidomonas* (CONCHON *et al*, 1989). Os gêneros *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Endotrypanum* e *Phytomonas* historicamente englobam espécies heteroxênicas. O ciclo evolutivo dos gêneros *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Endotrypanum* alterna um hospedeiro vertebrado e um invertebrado e no gênero *Phytomonas* o ciclo evolutivo das espécies alterna insetos e plantas (VICKERMAN, 1976).

As espécies dos gêneros *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia* e *Leptomonas*, juntamente com as espécies do gênero *Phytomonas*, são denominadas tripanosomatídeos inferiores (WALLACE, 1979; CAMARGO *et al*, 1992 e DOLLET, 1994).

A família Trypanosomatidae abrange protozoários com um único flagelo que se origina de uma abertura conhecida como bolsa flagelar e apresenta uma estrutura citoplasmática característica da família conhecida como cinetoplasto, que corresponde a uma condensação de DNA, correspondente a até 30% do DNA total da célula, localizada no interior de uma mitocôndria única. Organelas especiais do tipo peroxissoma, conhecidas como glicossomas e microtúbulos subpeliculares são também estruturas características (SOUZA, 2000).

Os estudos realizados com o objetivo de caracterizar a morfologia apresentada pelos tripanosomatídeos têm como base a simples observação de espécimes ao microscópio óptico. Amostras destes protozoários quando fixadas com metanol e coradas com Giemsa, possibilitam a observação nítida do núcleo e de organelas como o cinetoplasto e o flagelo. Com base na forma geral da célula (esférica, piriforme, alongada), na posição relativa entre o núcleo e cinetoplasto (anterior, lateral e posterior) e na forma de saída do flagelo da bolsa flagelar (terminal ou lateral), definem-se as principais formas evolutivas para os tripanosomatídeos: amastigota, esferomastigota, coanomastigota, opistomastigota, epimastigota e tripomastigota (SOUZA, 2000).

1.3 O Gênero *Phytomonas*

O gênero *Phytomonas* engloba tripanosomatídeos flagelados heteroxênicos parasitas de vegetais e que são economicamente importantes por serem responsáveis por fitopatologias no café, mandioca, coqueiros e dendezeiros. São parasitas do floema, látex e frutos ou sementes, com uma ampla diversidade de hospedeiros (CAMARGO, 1999; WALLACE *et al*, 1992).

Tripanosomatídeos de plantas são parasitas de algumas famílias vegetais com larga distribuição geográfica (CAMARGO *et al*, 1990; CAMARGO e WALLACE, 1994; DOLLET, 1994; VICKERMAN, 1994; WALLACE, 1992). Estes protozoários têm sido encontrados em 17 famílias de plantas e são transmitidos por insetos fitófagos pertencentes às famílias Coreidae, Lygaeidae, Pyrrhocoridae e Pentatomidae (UTTARO, 1997).

A primeira descrição da presença de flagelados em plantas foi realizada por Lafont (1909) estudando vasos lactíferos de *Euphorbia pilulifera*. Os tripanosomatídeos encontrados foram nomeados de *Leptomonas davidi*, em função deste flagelado apresentar características do gênero de *Leptomonas*.

Donovan (1909) observando o látex de *Euphorbia pilulifera* na Índia, encontrou o mesmo protozoário e propôs a criação de um novo gênero da família Trypanosomatidae para parasitas de vegetais: o gênero *Phytomonas*. Wenion (1926) publica um manual de protozoologia adotando formalmente a nomenclatura *Phytomonas* para diferenciar tripanosomatídeos parasitas de vegetais.

Stahel (1931) relaciona o parasita a uma fitopatologia conhecida como necrose do floema do café, que ocasiona o amarelamento e a queda prematura das folhas, com morte da árvore em 3 a 12 meses. Neste mesmo ano, no Brasil, Aragão detecta a presença de tripanosomatídeos em mandioca (*Manihot sp*), mas a doença só é reconhecida posteriormente,

na década de 80, como “chochamento das raízes”, resultado da infecção por *Phytomonas françai* (KITAJIMA *et al*, 1986).

Gibbs (1957) descreveu uma nova espécie de *Phytomonas*: *Leptomonas serpens*, parasita da glândula salivar de *Nezara viridula* e do tomate: *Solanum lycopersicum*.

Parthasarathy *e cols* (1976) descreveram o “Hartrot”, doença fatal que acomete coqueiros e observaram que os microrganismos encontrados no floema destes coqueiros eram tripanosomatídeos, descrevendo a doença como consequência à infecção por *Phytomonas*. Outra doença conhecida como “Marchitez sorpressiva” foi atribuída a protozoários do gênero *Phytomonas*, encontrados em placas crivadas do floema de dendezeiros (*Elais guineensis*) (DOLLET, 1977).

Jankevicius *e cols* (1982) encontraram tripanosomatídeos em varias espécies de Euforbiáceas e em insetos fitófagos. Fiorini *e cols* (1986) detectaram *Phytomonas* em tomate (*Solanum lycopersicum*) e em jiló (*Solanum gilo*). Tripanosomatídeos foram encontrados no feijão (*Phaseolus vulgares*) (ITOW JANKEVICIUS *et al*, 1987a) e na soja (*Glycine max*) (ITOW JANKEVICIUS *et al*, 1987b).

Experimentos com os insetos *Phitia picta* e *Nezara viridula* e culturas de tomate mantidos em laboratório possibilitaram determinar o ciclo biológico de *Phytomonas serpens*. Os insetos infectam-se pela via digestiva e o tripanosomatídeo é transmitido pela saliva do vetor no momento da picada (JANKEVICIUS *et al*, 1989).

Conchon e colaboradores em 1989 isolam tripanosomatídeos em bergamota (*Citrus bergomia*) e tangerina (*Citrus reticulata*). Almeida *e cols* (1990) cultivaram *Phytomonas sp* isoladas em sementes de urucum (*Bixa orellana*) e Fiorini *e cols* (1990) detectaram *Phytomonas sp* em laranja (*Citrus aurantium*, var. Lumia).

Catarino *e cols* (1991) cultivaram *Phytomonas sp* encontrados em romã (*Punica granatum*). No ano seguinte, Carrara *e cols* detectaram estes tripanosomatídeos em laranja (*Citrus aurantium*, var Pêra) e em uvas (*Vitis vinifera* var. Rubi e Itália).

Cavazzana *e cols* (1993) conseguem obter tripanosomatídeos em amora (*Morus sp*) e feijão guandu (*Cajanus flavus*). No mesmo ano, Itow Jankevicius *e cols* isolam tripanosomatídeos de milho (*Zea mays*) e Fiorini *e cols* cultivam tripanosomatídeos isolados de *Euphorbia pilulifera*, *E. próstata*, *E. brasiliensis* e *E. cathartica*.

Cavazzana *e cols* (1995) isolam *Phytomonas sp* de maçã (*Malus sp*) e um ano depois cultivam *Phytomonas* isolados de Pitanga (*Eugenia sp*).

O gênero *Phytomonas* abriga grupos de parasitas intrafloema, onde estes tripanosomatídeos estão associados com as síndromes patológicas e constituem o grupo mais exigente quanto ao cultivo “in vitro”, necessitando de meios de cultura de células de inseto acrescentado de soro bovino fetal. As *Phytomonas* dos tubos lactíferos aparentemente não causam sintomas patológicos à planta e são facilmente cultivadas “in vitro”. Os tripanosomatídeos que parasitam exclusivamente frutos não se disseminam para outras partes da planta e multiplicam-se rapidamente em meio de cultura, sendo facilmente cultivadas (DOLLET, 1984).

Tripanosomatídeos de plantas tem sido classificados como *Phytomonas* somente pelo hospedeiro de origem. Entretanto, este critério é insuficiente, pois outros tripanosomatídeos podem ser recuperados de plantas (TEIXEIRA, 1995). A morfologia do protozoário também é insuficiente para caracterização do gênero *Phytomonas*, pois muitos flagelados de plantas e hemípteros apresentam formas promastigotas, forma encontrada também em outros gêneros pertencentes à família *Trypanosomatidae* (WALLACE, 1992). Dessa maneira, é necessário estabelecer outros critérios taxonômicos para a identificação de

Phytomonas. Segundo Conchon *e cols* (1989), técnicas bioquímicas e de biologia molecular podem ser aplicadas para a caracterização taxonômica do gênero *Phytomonas*.

Teixeira e Camargo (1989) produziram anticorpos monoclonais específicos contra *Phytomonas serpens* e *Phytomonas françai*, diferenciando parasitas deste gênero de várias espécies de tripanosomatídeos de outros gêneros, obtendo assim um critério de alta especificidade. Entretanto, alguns isolados de *Phytomonas* não reagiram igualmente com os anticorpos monoclonais testados e nenhum destes anticorpos reconheceu todos os isolados, sugerindo um certo grau de variabilidade de epítomos entre as espécies estudadas. Muller *e cols* (1997) têm demonstrado a heterogeneidade genética de tripanosomatídeos de plantas estudando isoenzimas e o DNA do cinetoplasto.

Foi demonstrado por técnicas de RAPD e análise de isoenzimas que há uma clara separação entre tripanosomatídeos de floema, de vasos lactíferos e de frutos, com evidente polimorfismo genético entre estes protozoários (MULLER *et al*, 1997). A atividade da enzima iso-propanol desidrogenase (iPDH) em combinação com a da α hidroxidiácido desidrogenase (α HADH) e malato desidrogenase foi utilizada para classificar flagelados de plantas dentro de grupos distintos (UTTARO, 1997).

Teixeira *e cols* (2000) utilizando a técnica de PCR (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*) com um primer específico para o gênero *Phytomonas* conseguiram fragmentos que após puderam ser hibridizados com uma sonda específica para o gênero *Phytomonas*, o que tornou essa técnica bastante eficaz. Este método não mostrou reação com nenhum outro gênero da família, revelando ser eficaz na detecção de espécies de *Phytomonas* do fruto, látex ou do floema de várias plantas hospedeiras, bem como de glândula salivar ou do tubo digestivo de algumas espécies de insetos. Essa técnica também permitiu que amostras fixadas em lâminas ou material recém retirado de insetos e frutos, e não culturas puras, pudessem ser analisadas.

1.4 Doença de Chagas e o *Trypanosoma Cruzi*

O protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* é o causador da Doença de Chagas (DC) ou tripanosomíase americana, uma zoonose que segundo dados da Organização Mundial de Saúde (O.M.S.), acomete entre 16 e 18 milhões de pessoas infectadas nas Américas e quase 90 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas estão expostas ao risco de infecção pelo *T. cruzi*, além da constante migração de indivíduos infectados para áreas não endêmicas, exigindo assim um diagnóstico eficiente e prático (SCHMUNIS, 1991).

A Doença de Chagas caracteriza-se pela existência de uma fase aguda, na qual a parasitemia patente é comumente observada seguida por uma fase crônica, onde a carga parasitária é controlada sem que haja completa eliminação dos parasitas. No homem, a fase aguda da infecção é pouco sintomática. Na fase crônica 30% dos indivíduos infectados desenvolvem patologias que podem se manifestar por insuficiência cardíaca, distúrbios do ritmo e da condução cardíacos ou dilatações do trato digestivo (ANDRADE e ANDRADE, 2000).

A produção de IFN- γ por células “natural killer” (NK) na fase aguda inicial da infecção chagásica experimental mostra a função protetora desta citocina relacionada com o controle intracelular do parasita, principalmente pela indução da biossíntese de óxido nítrico (NO) (SILVA *et al*, 1998) com atividade tripanocida em macrófagos infectados (GAZZINELLI *et al*, 1992).

Durante a infecção pelo *T. cruzi*, os macrófagos apresentam dupla função em relação ao parasita: por um lado funcionam como células hospedeiras para multiplicação e diferenciação do *Trypanosoma* em estágios infectantes, e por outro lado, atuam como células efetoras da resposta imunológica (BRENER; KRETTLI, 1990).

Nathan *et cols* (1979) correlacionaram a importância dos macrófagos na resistência ao *T. cruzi* devido à destruição dos estágios intracelulares do parasito com a capacidade destes em liberar metabólitos tóxicos do O₂, como por exemplo, H₂O₂. Contudo, não foi possível encontrar correlação entre a produção de H₂O₂ e a resistência à infecção, pois macrófagos peritoniais de camundongos susceptíveis infectados com a cepa CL de *T. cruzi*, liberam níveis significativamente maiores de H₂O₂ que os macrófagos dos animais resistentes (RUSSO *et al*, 1989).

O tratamento de macrófagos ativados com catalase, superóxido dismutase ou benzoato de sódio, removedores de metabólitos produzidos no “burst” respiratório, falharam em inibir a habilidade dos macrófagos em eliminar o parasita *T. cruzi* “in vitro” (McCABE e MULLINS, 1990). Estes resultados colocaram em evidência que a ocorrência de morte do parasito, independente do oxigênio, é uma importante atividade exercida pelos macrófagos contra *T. cruzi*. Posteriormente, ficou demonstrado que esta capacidade tripanocida era mediada principalmente pela produção de intermediários reativos do Nitrogênio (RNI), em particular o óxido nítrico (NO), tanto *in vitro* (GAZZINELLI *et al*, 1992) como *in vivo* (VESPA *et al*, 1994).

Outra citocina, a IL-12, é um forte indutor da produção de IFN- γ por células NK e células T (SILVA *et al*, 1998; ALIBERTI *et al*, 1996), modulando a produção de IFN- γ por células NK (CHAN, 1991). Verificou-se que TNF- α é produzido por macrófagos na presença de tripomastigotas vivos, e que juntos, IFN- γ e TNF- α , atuam de maneira autócrina, promovendo a produção de NO e conseqüentemente controlando a quantidade de parasitas circulantes (MARTINS *et al*, 2000).

Ainda durante a resposta imune inata ocorre a produção de IL-10, cuja ação regulatória desta citocina produzida por macrófagos, pode inibir o efeito tripanocida do IFN- γ , a produção de IL-12 e o efeito estimulatório da IL-12 sobre a produção de IFN- γ por células

NK (CARDILLO *et al*, 1996), minimizando os efeitos tóxicos causados por uma grande produção de citocinas inflamatórias IL-12 e IFN- γ . Citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β inibem a função anti-tripanosomal do IFN- γ de macrófagos ativados, ao mesmo tempo suprimindo a produção de NO. *In vivo* constatou-se que IL-10 e TGF- β potencializam a infecção, uma vez que camundongos susceptíveis à infecção pelo *T.cruzi* produzem um elevado nível destas citocinas (SILVA *et al*, 1991).

Foi demonstrada a existência de correlação em diferentes linhagens murinas entre susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* e a produção elevada de IL-10 (REED *et al*, 1994; MINOPRIO *et al*, 1993). Animais geneticamente deficientes de IL-10 e susceptíveis à infecção regulam melhor a parasitemia e a carga parasitaria no tecido cardíaco, mas morrem precocemente devido à toxicidade causada pelo nível exacerbado de citocinas do tipo 1: IL-12, TNF- α e INF- γ (HUNTER *et al*, 1997).

Estudos demonstraram que durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos, ocorre ativação de altos níveis de linfócitos B e T(CD $_4^+$ e CD $_8^+$) e linfócitos autoreativos (MINOPRIO *et al*, 1989) que persistem durante meses (D'IMPERIO LIMA *et al*, 1985; MINOPRIO *et al*, 1989). Na resposta imune humoral ocorre ativação policlonal de células B, uma vez que a maioria dos linfócitos ativados não reconhece antígenos do *T. cruzi* (D'IMPERIO LIMA *et al*, 1985) com as células B produzindo freqüentemente IgG $_2$ (MINOPRIO *et al*, 1989).

A maioria das células B ativadas secretam anticorpos não específicos ao parasita (MINOPRIO *et al*, 1989). Acredita-se que, pelo menos em parte, a imunossupressão constatada durante a fase aguda da infecção e a autoimunidade associada com a infecção crônica (REED *et al*, 1988) poderiam estar relacionadas com a intensa ativação policlonal no estágio inicial da infecção (MINOPRIO *et al*, 1989).

Demonstrou-se o papel de linfócitos T CD₄-Th1 na produção de IL-2 e IFN- γ protegendo contra a replicação intracelular do *T. cruzi*. Além disso, células CD₄-Th1 podem exercer um papel citolítico em células infectadas e contribuir para expansão de linfócitos T CD₈⁺ que reconhecem e destroem células infectadas (HOFT *et al*, 2000).

A importância de células T CD₄⁺ na infecção experimental por *T. cruzi* (SPINELLA *et al*, 1990), tem sido atribuído à ajuda na produção de anticorpos líticos protetores e ou na produção de citocinas que atuam em macrófagos eliminando o parasita intracelular (BRENER, 1980).

Avaliando a importância das células T CD₈⁺ constata-se que *T. cruzi* é capaz de invadir e se replicar em uma variedade de células hospedeiras que não expressam antígenos via MHC de classe II (BRENER, 1994; ANDRADE, 1991), e conseqüentemente, escapam da detecção por células CD₄⁺. Além disso, no estágio intracelular, o *T. cruzi* abandona o aparato vacuolar, e alcança o citoplasma, ficando antígenos do parasita potencialmente acessíveis à via MHC de classe I de apresentação de antígenos. A predominância de respostas Th1, caracterizada pela produção de IFN- γ e IL-12, está associada com a cura em infecções experimentais por *Leishmania*, enquanto que uma resposta Th-2, caracterizada pelas citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, está associada com a exacerbação da doença (HEINZEL *et al*, 1991). Em camundongos infectados com *T. cruzi*, ambas respostas Th-1 e Th-2 estão envolvidas durante a infecção (SILVA *et al*, 1991).

Os mecanismos pelos quais o *Trypanosoma cruzi* consegue escapar da resposta imune ainda não estão completamente elucidados, mas, alguns passos da estratégia de evasão já estão elucidados como é o caso da evasão da lise pelo sistema complemento através da expressão de uma glicoproteína de 160 kDa (gp160) que simula a atuação do DAF (do inglês *Decay-accelerating-factor*) humano, uma molécula que limita o efeito do sistema complemento (JOINER, 1988). Outro mecanismo de evasão importante é a capacidade de

perfurar o vacúolo parasitóforo e escapar para o citoplasma da célula do hospedeiro através de uma molécula secretada pelo *T. cruzi* conhecida como Tc-TOX, a qual tem a capacidade de formar poros na parede do vacúolo e permitir a passagem do parasita. (ANDREWS *et al*, 1990).

Também são conhecidos outros mecanismos como a endocitose de anticorpos pelo parasita, o polimorfismo genético, a expressão de vários imunodeterminantes antigênicos (ativação policlonal de células B e T), o mimetismo antigênico, a supressão da liberação de IFN- γ por linfócitos Th-1, a ativação policlonal de células B e T e a excessiva produção de TNF- α . (TAFURI, 1999).

Correndo atrás do parasita, inúmeras tentativas com imunizações já tentaram, algumas com relativo sucesso, conseguir uma “vacina” ou alguma forma de proteção contra uma infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Luhrs *e cols* (2003) utilizando uma proteína “paraflagelar rod” (PFR, *paraflagelar rod protein*) conseguiu uma proteção efetiva, com 100% de sobrevivência, ante um desafio letal da cepa Peru de *T. cruzi* e uma diminuição significativa da parasitemia, com a relevância dessa proteína ser altamente conservada entre diversas cepas de *T. cruzi* analisadas.

Imunização genética parece ser uma boa fonte de proteção, como mostrada por Garg e Tarleton (2002) onde camundongos imunizados com plasmídeos contendo genes codificantes de três *trans*-sialidases de *T. cruzi* com a ajuda de adjuvantes conseguiram até 80% de sobrevivência frente a uma dose letal do protozoário.

Hoft e Eickhoff (2002), pensando numa proteção sistêmica e das mucosas, estabeleceram um protocolo com um lisado total de *T. cruzi*, inoculado intranasalmente com a ajuda de um adjuvante mais citocinas (IL-12 ou IL-4) para direcionar o tipo de resposta

desejada. Neste modelo os autores conseguiram uma proteção efetiva tanto sistemicamente quanto nas mucosas quando utilizado o padrão Th-1.

Schnapp *et cols* (2002) utilizando uma cisteinil proteinase presente em todas as fases de desenvolvimento e cepas do parasita e também bastante conservada entre as cepas, a cruzipaina numa forma recombinante, obtiveram sobrevivência de 80% e diminuição significativa da parasitemia em modelos murinos desafiados com uma cepa virulenta de *T. cruzi*.

1.5 Relações Antigênicas e Sorodiagnóstico da Doença de Chagas

Um dos aspectos importantes na família Trypanosomatidae é a relação antigênica entre os gêneros e espécies que traz como conseqüência uma enorme dificuldade para o diagnóstico sorológico diferencial das diversas parasitoses humanas causadas por estes protozoários. A reação cruzada entre infecções por protozoários é bastante comum, principalmente no Brasil, área endêmica da doença de Chagas e de vários tipos de Leishmaniose, que influencia no diagnóstico sorológico para essas doenças principalmente em serviços hospitalares de triagem como banco de sangue ou transplantes que utilizam testes sorológicos muito sensíveis para escapar de falsos-negativos, mas muitas vezes pouco específicos, permitindo a perda de possíveis doadores.

A interrupção na transmissão vetorial e por transfusão sanguínea da doença de Chagas no Uruguai em 1997, no Chile em 1999 e em 8 de 12 regiões endêmicas no Brasil em 2000 e a diminuição em 70% da transmissão nos países do Cone Sul torna a missão do diagnóstico cada vez mais difícil e necessitando de um maior critério para a definição do positivo e resultados com reações cruzadas têm de ser avaliados com o maior cuidado possível (MONCAYO, 2003).

A procura de testes cada mais específicos e sensíveis na detecção da Doença de Chagas tem sido alvo de intensa busca pelos pesquisadores, principalmente quanto à diferenciação das Leishmanioses e a procura por antígenos específicos nestes parasitas que poderiam diferenciar em testes sorológicos uma ou outra patologia.

Vexenat *e cols* (1996) utilizando soros chagásicos, de Leishmaniose mucocutânea (LMC) e calazar obtiveram uma reação cruzada com antígenos heterólogos na Imunofluorescência Indireta (IFI) e ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*). Na IFI com antígenos de *Trypanosoma cruzi* obtiveram 100% de positividade em diluições maiores que 1:20 para soros chagásicos, LMC e calazar. Com antígenos de *Leishmania chagasi* no teste de ELISA obtiveram 98, 100 e 100% de positividade para soros chagásicos, calazar e LMC, respectivamente.

O uso de diferentes preparações para os antígenos de *T. cruzi* utilizados nos testes também são causa de reações cruzadas. Utilizando antígenos de teste de fixação de complemento, hemaglutinação indireta, de ensaio imuno enzimático, teste intradérmico, um antígeno de proteína preservado e um antígeno nativo total de epimastigotas, Mendes *e cols* (1997) realizaram um “imunoblot” com soros chagásicos e leishmanióticos que, dependendo do tipo de antígeno utilizado, apresentaram semelhanças e diferenças onde somente um tipo de antígeno (proteína preservada) conseguiu estabelecer um painel que fosse capaz de diferenciar os soros chagásicos e leishmanióticos.

Leguizamón *e cols* (1998) empregaram um teste de inibição da *trans*-sialidase em uma população com alto risco de infecção por *Trypanosoma cruzi* que acabou por mostrar que de 20 soros apresentados como negativos por métodos sorológicos e parasitológicos convencionais, 18 acabaram se mostrando positivos sob esta técnica de inibição da *trans*-sialidase, o que poderia indicar que os casos da Doença de Chagas estão sub-estimados.

A utilização de antígenos recombinantes parece ser uma alternativa que vem apresentando grandes resultados. Umezawa e Silveira (1999), utilizando diversos antígenos recombinantes de *T. cruzi* com o método de ELISA, conseguiram uma sensibilidade entre 87 e 99% e uma especificidade entre 96,2 e 99,6%, enquanto um antígeno total de epimastigota mostrou 100% de sensibilidade, mas somente 84% de especificidade, principalmente da decorrência de reações cruzadas com Leishmanioses. O uso destes antígenos recombinantes em conjunto parece prover melhores resultados nesta distinção. Tanto antígenos recombinantes como antígenos sintéticos sendo usados em testes de detecção sorológica como ELISA, “immunodot”, “line immunoassay” ou “particle gel immunoassay” mostraram sensibilidade variando entre 96,8 e 100% e especificidade entre 92,3 e 100%, que são valores excelentes para usos como em bancos de sangue ou transplantes e até monitoramento de cura (DA SILVEIRA, 2001).

Meira *e cols* (2002) usando uma proteína regulatória do complemento do *Trypanosoma cruzi* recombinante conseguiram para o teste de ELISA, sensibilidade e especificidade de 100% e quando realizado outros testes como hemocultura e PCR, estes só conseguiram sensibilidade de 64,62 e 81,54% respectivamente.

Utilizando três proteínas recombinantes como antígenos, Umezawa *e cols* (2003) num teste de ELISA conseguiram resultados diferentes de testes realizados com testes convencionais (imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta e ELISA). Em um total de 894 soros foram alcançadas uma sensibilidade de 99,7% e especificidade de 98,6%. E em 451 soros com resultados discrepantes com os três testes mencionados conseguiram diminuir em 99,6% a discrepância nos resultados.

O uso de Western Blot para a confirmação de diagnóstico da Doença de Chagas e Leishmaniose pode ser uma alternativa para casos suspeitos não confirmados. A reação cruzada observada entre membros da família Trypanosomatidae foi testada num ensaio

com soros chagásicos, de Leishmaniose Mucocutânea e de Calazar contra antígenos de *T. cruzi*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* onde se estabeleceu um perfil de bandas protéicas de cada antígeno que permite distinguir cada amostra de soro chagásico, de leishmaniose mucocutânea ou calazar (GONÇALVES *et al*, 2002).

Reiche *e cols* (1998) demonstraram o uso de Western Blot para o diagnóstico confirmatório da Doença de Chagas e suas várias reações cruzadas com outras patologias tais como Leishmaniose, doenças auto-imunes, sífilis e paracoccidiodomicose.

Esta relação imunológica é evidenciada entre membros distantes da família Trypanosomatidae como tripanosomatídeos parasitas de vegetais e os parasitas humanos (BREGANÓ *et al*, 2003; GONÇALVES *et al*, 2002). Estes parasitas de vegetais não conseguem desenvolver infecção em animais, pois não se desenvolvem à 37°C (GUTHER *et al*, 1988) são lisados pelo sistema complemento animal, mas induzem uma resposta imune específica (CARRARA, 1994). Esta relação antigênica entre parasitas de vegetais e parasitas humanos traduz vários aspectos de interesse prático, como a utilização de antígenos de parasitas não patogênicos, inócuos ao homem para o diagnóstico imunológico laboratorial da Doença de Chagas, reduzindo a possibilidade de infecção laboratorial acidental, devido à manipulação de parasitas patogênicos.

A relação antigênica entre membros da família Trypanosomatidae foi inicialmente evidenciada entre tripanosomatídeos inferiores de insetos e várias espécies de *Leishmania*, por Noguchi (1926). Clark (1958) confirmou os resultados de Noguchi (1926) utilizando soros com altos títulos e verificou que amostras de *Herpetomonas* eram na realidade espécies pertencentes ao gênero *Crithidia*. Vitteta e Guttman (1967) observaram a existência de reatividade cruzada entre amostras de *Crithidia fasciculata* e *Crithidia oncopelti* por meio da reação de aglutinação de protozoários vivos com soros obtidos da imunização de coelhos utilizando adjuvante completo de Freund (CFA). Becker (1960) estudou as relações

antigênicas entre flagelados de insetos do gênero *Herpetomonas* e *Leptomonas*, por meio de técnicas de aglutinação, precipitação e crescimento em meio de cultura com soros imunes, constatando a existência de antígenos comuns entre as amostras estudadas.

Lopes *e cols* (1981) constataram a reação imunológica cruzada entre tripanosomatídeos de insetos e *T. cruzi* utilizando soros humanos de pacientes chagásicos e não chagásicos. Os resultados mostraram que os soros positivos reagiram com tripanosomatídeos inferiores na reação de Imunofluorescência Indireta e estes resultados foram corroborados por reações de adsorção. Foi verificado também que os soros anti-tripanosomatídeos inferiores obtidos de camundongos e coelhos reagem com antígenos de *T. cruzi*. Estes resultados revelam a existência de determinantes antigênicos comuns entre tripanosomatídeos monoxênicos e *T. cruzi*, possibilitando o uso de antígenos desses tripanosomatídeos nas reações sorológicas para o diagnóstico da Doença de Chagas.

Santos *e cols* (1975) utilizando *Leptomonas pessoai* como antígeno verificaram alta positividade de soros de pacientes chagásicos nas reações de fixação de complemento, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta.

Vattuone e Yanovsky (1971), usando a técnica de aglutinação direta verificaram que soros de pacientes chagásicos aglutinaram formas epimastigotas de *T. cruzi* e formas de *Crithidia oncopelti*. Observaram a redução parcial do título destes soros em aglutinar antígenos de *T. cruzi* após adsorção com formas de *Crithidia oncopelti*, constatando a existência de reação cruzada entre eles.

Com a finalidade de distinguir diferentes isolados do gênero *Phytomonas*, Petry *e cols* (1989), produziram anticorpos monoclonais e policlonais, sendo que estes não foram capazes de diferenciar *Phytomonas* de outros tripanosomatídeos, incluindo *T. cruzi*, devido a ocorrências de inúmeras reações cruzadas.

As relações antigênicas existentes entre os gêneros *Trypanosoma* e *Phytomonas* já foram demonstradas (BREGANÓ *et al*, 2003), observando-se que camundongos BALB/c imunizados com *Phytomonas serpens* e desafiados posteriormente com um inóculo letal de *T. cruzi* obtinham uma imunoproteção parcial com aumento da sobrevivência e diminuição da parasitemia dos animais.

Graça (2002) demonstrou a possível participação da imunidade celular nessa reação cruzada com linfócitos de camundongos imunizados com *Phytomonas serpens* sendo capazes de proliferar frente a um estímulo posterior de *Trypanosoma cruzi* e da própria *Phytomonas serpens*, mas não de duas espécies de *Leishmania*.

Uma possível proteína envolvida nessa reatividade cruzada seria uma proteína de 24 kDa pertencente à família das proteínas flagelares ligantes de cálcio (FcaBp, *flagellar calcium binding protein*) que foram encontradas no *Trypanosoma cruzi* e na *Phytomonas serpens*, mas não na *Leishmania amazonensis* (MALDONADO, 1997).

Essa mesma proteína ligante de cálcio poderia ser usada como antígeno para diagnóstico sorológico, como feita por Godsel *e cols* (1995) utilizando a FcaBp de 24 kDa recombinante que demonstrou alta especificidade e sensibilidade.

A presença de imunidade provinda da presença de microorganismos inócuos do ambiente (GEGINAT *et al*, 1999) tem fundamental importância numa possível participação de resposta cruzada contra patógenos e se sabendo da relação antigênica entre os tripanosomatídeos parasitas humanos e de plantas seria possível perguntar qual o envolvimento do consumo de alimentos que consumidos *in natura* e contaminados com protozoários, qual seria a interferência no desenvolvimento da Doença de Chagas e no seu diagnóstico.

2. REFERÊNCIAS

- ALIBERTI, J. C. S. et al. IL 12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in responses to live trypomastigotes. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 1961-1967. 1996.
- ALMEIDA, M. L. et al. Isolation axenic cultivation and ultra structural characterization of *Phytomonas sp* in urucum (*Bixa orellana*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 135. 1990.
- ANDRADE, Z. A. Pathogenesis of Chagas disease. **Res. Immunol**, v. 142, p. 126-129. 1991.
- ANDRADE, Z. et al. *Trypanosoma cruzi* e Doenças de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- ANDREWS, N.W. et al *Trypanosoma cruzi* secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, v. 61, p. 1277-1287. 1990.
- ARAGÃO, H.B. Pesquisas sobre *Phytomonas françai*. **Rev. Biol. Hyg.**, v. 11, p.185-189. 1931.
- ARULANDAM, B.P.; O'TOOLE, M.; METZGER, D.W. Intranasal interleukin-12 is a powerful adjuvant for protective mucosal immunity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 940-949. 1999.
- BECKER, Y. Antigenic relations between insect flagellates of the genera *Herpetomonas* and *Leptomonas* (Family Trypanosomatidae). **Bull. Res. Council. of Israel**, v. 8, p.147-156. 1960.
- BREGANÓ, J.W. et al. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 39, p. 257-264. 2003.
- BRENER, Z. Chagas Disease and the Nervous System. **PAHO Scientific Public.**,v. 547,p. 30-46. 1994.
- _____. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Advances in Parasitology**, v. 18, p. 247-301. 1980.
- _____. KRETTLI, A.V. Immunology of Chagas Disease. In: WYLER, D.J. **Modern Parasite Biology: Cellular, Immunological and Molecular Aspects**. USA: WH Freemans and Company, 1990.
- CAMARGO, E.P. *Phytomonas* and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Advances in Parasitology**, v. 42, p. 29-112. 1999.

_____. et al. Ribosomal DNA restriction analyses and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower Trypanosomatids. **Journal of Parasitology**, v.78, p. 40-48. 1992.

_____.; KASTELEIN, P.; ROITMAN, I. Trypanosomatid parasites of plants (*Phytomonas*). **Parasitology Today**, v. 6, p. 5-22. 1990.

_____.; WALLACE, G. Vectors of plants parasites of the genus *Phytomonas* (Protozoa, Zoomastigophora, Kinetoplastida). **Advances in Disease Vector Research**, p. 1333-1359. 1994.

CARLE, V.; RASK, C.; SUN, J.B. Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. **Immunological Reviews**, v. 170, p. 197-222. 1999.

CARDILLO, F. et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice IFN- γ and IL-10: Role of NK cells. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 128-134. 1996.

CARRARA, F. E. et al. Detection "in vitro" cultivation of flagellate protozoa found in orange (*Citrus aurantium* cultivar pêra) and in grape (*Vitis vinifera*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 241. 1992.

_____. **Estudos sorológicos em tripanosomatídeos isolados de plantas e insetos fitófagos**. 1994. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Estadual de Londrina.

CATARINO, L. M. G. M. et al. Axenic cultivation and ultrastructure of *Phytomonas sp* from pomegranate (*Punica sp*) and from phytophagous hemipteran *Leptoglossus sp*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 271. 1991.

CAVAZZANA JR, M. et al. Detection and isolation of protozoa in pitanga (*Eugenia sp* Myrtaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 1996.

_____. et al. Isolation and cultivation of trypanosomatids from mulberry (*Morus sp*) and "guandu" beans (*Cajanus flavus*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 282. 1993.

_____. et al Isolation and *in vitro* cultivation of trypanosomatids found in apple (*Malus sp*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p.246. 1995.

CERKINSKY, C. et al. Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. **Immunological reviews**, v. 170, p. 197-222. 1999.

CHALLACOMBE, S.J.; TOMASI JR, T.B. Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. **Journal of Experimental Medicine**, v. 152, p. 1459-1472. 1980.

CHAN, S.H. et al. Induction of interferon- γ production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducer. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, p. 869-879. 1991.

CLARK, T.B. **A comparative serological and morphological study of the family Tripanosomatidae**. Doflein, 1901. Doctoral thesis. University of Minnesota, Department of Zoology. 1958.

CONCHON, I et al. Trypanosomatids, other than *Phytomonas spp*, isolated and cultured from fruit. **Journal of Protozoology**, v. 36, p. 412-414. 1989.

CONDE, A. A. et al. Interruption of recently induced immune responses by oral administration of antigen. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 377-380. 1998.

D'IMPÉRIO LIMA, M. R. et al. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Immunology**, v.15, p. 201-203. 1985.

DOHERTY, T. M. et al. vaccination with subunit vaccines protects animals against aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v.70, p. 3111-3121. 2002.

DOLLET, M. Identification and characterization of pest organisms: A plant trypanosomes case study. In: WANKSWORTH, D.D. **The identification and characterization of pest organisms**. 1994.

DOLLET, M.; GIANOTTI, M.; OLLANGNIER, M. Observation de protozoaires flagellés das lês tubes cribles de palmiers à huile malades. **C.R. Acad. Sci. Ser.**, v. 284, p. 643-645. 1977.

DOLLET, M. Plant diseases caused by flagellate Protozoa (*Phytomonas*). **Annual Review of Phytopathology**, v. 22, p. 115-132. 1984.

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

ERIKSSON, E.; HOLMGREN, J. Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, p.666-672. 2002.

EVEREST, P.; GRIFFITHS, P.; DOUGAN, G. Live *Salmonella* vaccines as a route towards oral immunisation. **Biologicals**, v. 23, p. 119-124. 1995.

FIORINI, J. E. et al. Axenic cultivation of a pathogenic *Phytomonas* species isolated from tomato fruit and from its phytophagic insect vector, *Phitia picta* (Hemíptera, Coreidae). **Cytobios**, v. 75, p. 163-170. 1993.

_____. et al. Cultivation of a *Phytomonas* isolated from orange (*Citrus aurantium* L. var *Lumia*) and *Leptoglossus stigma* (Hemíptera Coreidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 134. 1990.

_____. et al. Detection of trypanosomatids in the *Solanum gilo* and *Solanum lycopersicum* in Alfenas, MG-Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 33. 1986.

GARG, N.; TARLETON, R.L. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune response and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 5547-5555. 2002.

GEGINAT, G. et al. A. Enhancement of the *Listeria monocytogenes* p60-specific CD4+ and CD8+ T cell memory by nonpathogenic *Listeria innocua*. **The Journal of Immunology**, v.162, p. 4781-4789. 1999.

GAZZINELLI, R.T. et al.. The microbicidal activity of IFN- γ treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L- arginine dependent, nitrogen oxid- mediated mechanism inhibitable by IL-10 and IFN- α . **European Journal of Immunology**, v. 22, p. 2501-2506. 1992.

GIBBS, A.J. *Leptomonas serpens* n sp parasitic in the digestive tract and salivary gland of *Nezara viridula* (Pentatomidae) and in the sap of *Solanum lycopersicum* (Tomato) and other plants. **Parasitology**, v. 47, p. 297-303. 1957.

GONÇALVES, C. C. M. et al. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a Western Blot for diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 91-102. 2002.

GRAÇA, V.K. **Avaliação da resposta imune humoral e celular contra *Trypanosoma cruzi* de camundongos imunizados com *Phytomonas serpens***. 2002. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

GUTHER, M.L.; TRAVASSOS, L.R.; SCHENKMAN, S. Identification of C3 acceptors responsible for complemet activation in *Crithidia fasciculata*. **Journal of Protozoology**, v.35, p. 475-80. 1988.

HAAN, L. et al. Nasal or intramuscular immunization of mice with influenza subunit antigen and the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile toxin induces IgA- or IgG-mediated protective mucosal immunity. **Vaccine**, v. 19, p. 2071-2907. 2001.

HEINZEL, F.P. et al Production of IFN- γ , IL-2, IL-4, and IL-10 by CD4+ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proceedings of National Academia of Science of USA**, v. 88, p.7011-7015. 1991.

HOFT, D.F.; SCHNAPP, A.R.; C. S.; ROODMAN, S.T. Involvement of CD4+ Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v.68, p. 197-204. 2000.

_____. ; EICKOFF, C.S. Type 1 immunity provides optimal protection against both mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* challenges. **Infection and Immunity**, v.70, p. 6715-6725. 2002.

HOLMGREN, J. et al Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. **Vaccine**, v.21, p. 89-95. 2002.

HUNTER, C.A. et al IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology**, v. 158, p. 3311-3316. 1997.

ITOW JANKEVICIUS, S. et al Axenic cultivation of trypanosomatids found in corn (*Zea mays*) and Phytophagous Hemipterans (*Leptoglossus zonatus*, Coreidae) and their experimental transmission. **Journal of Eukariotic Microbiology**, v. 40, p. 576-581. 1993.

ITOW JANKEVICIUS, S. et al *Phytomonas* sp found in leguminous crops. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 42. 1987b.

ITOW JANKEVICIUS, S. et al Presence of protozoa of the genus *Phytomonas* in leguminosus crops. **Fitopatol. Brazil**, v. 12, p. 152. 1987a.

JANKEVICIUS, J.V. et al. The life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a tripanosomatid parasite of tomatoes. **Journal of Protozoology**, v. 36, p. 265-271. 1989.

JANKEVICIUS, J.V. et al Tripanosomatídeos do gênero *Phytomonas* em Londrina, Paraná. REUNIÃO ANUAL PESQUISA BÁSICA EM DOENÇAS DE CHAGAS, 9, Londrina, **Anais...**, 1982. p. 124.

JOINER, K.A. Complement evasion by bacteria and parasites. **Annual Review of Microbiology**, v.42. p. 201-230. 1988.

KITAJIMA, E.W.; VAINSTEIN, M.H.; SILVEIRA, J.M. Flagellate protozoan associated with poor development of the root system of cassava in the Espírito Santo state, Brazil. **Phytopathology**, v.76, p. 638-642. 1986.

KONG, Q. et al. Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, v. 98, p. 11539-11544. 2001.

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

LEGUIZAMÓN, M. S. et al. Use of *trans*-sialidase inhibition assay in a population serologically negative for *Trypanosoma cruzi* but at a high risk of infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, p. 254-255. 1998.

LI, T.; TAKEDA, N.; MIYAMURA, T. Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. **Vaccine**, v. 19, p. 3476-3484. 2001.

LOPES, J.D. et al. Cross- reactivity between *Trypanosoma cruzi* and insect trypanosomatids as a basis for the diagnosis of Chagas disease. **American Journal of Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 1183-1188. 1981.

LUHRS, K.A.; FOUTS, D.L.; MAINING, J.E. Immunization with recombinant paraflagellar rod protein induces protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. **Vaccine**, v. 21, p. 3058-3069. 2003.

MACBE, R.E.; MULLINS, B.T.; Failure of *Trypanosoma cruzi* to trigger the respiratory burst of activated macrophages. Mechanism for immune and importance of oxygen-independent killing. **Journal of Immunology**, v. 144, p. 2384-2388. 1990.

MALDONADO, R. A. et al. Homologues of the 24-kDa flagellar Ca²⁺-binding protein gene of *Trypanosoma cruzi* are present in other members of the Trypanosomatidae family. **Experimental Parasitology**, v. 86, p. 200-205. 1997.

MARTINS, G.A.; ALIBERTI, J.C.S.; SILVA, J.S. Participação de citocinas no determinismo de resistência ou susceptibilidade à infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*. In: JORGE ARAÚJO, T.C.; LISBOA DE CASTRO, S. **Doença de Chagas Manual para experimentação animal**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2000.

MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. **Science**, v. 296, p. 301-305. 2002.

McCLUSKIE, M. J. et al. CpG DNA is an effective oral adjuvant to protein antigens in mice. **Vaccine**, v. 19, p. 950-957. 2000.

McWILLIAMS, M.; PHILLIPS-QUAGLIATA, J.; LAMM, M. Mesenteric lymph node B lymphoblasts which home to the small intestine are precommitted to IgA synthesis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 145, p. 866-875. 1977.

MEIRA, W.S.F. et al. *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 3735-3740. 2002.

MENDES, R.P. et al. Serological diagnosis of chagas' disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1829-1834. 1997.

MINOPRIO, P. et al. Immunobiology of *T. Cruzi* infection: the predominance of parasite nonspecific responses and the activation of TCR 1 T cells. **Immunology Reviews**, v. 112, p. 83-207. 1989.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 577-591. 2003.

MUKHOPADHAYA, A. et al. Protective efficacy of oral immunization with heat-killed *Shigella flexneri* 2a in animal model: study of cross protection, immune response and antigenic recognition. **Vaccine**, v. 21, p. 3043-3050.

MULLER, E.; GARGANI, D.; BANULS, A.L.; TIBAYRENC, M.; DOLLET, M. Classification of plant Trypanosomatids (*Phytomonas ssp*): party between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. **Parasitology**, v.115, p. 403-409. 1997.

NIKURA, M.; TAKAMURA, S.; KIM, G. Chimeric recombinant hepatitis and virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. **Virology**, v. 293, p. 272-280. 2002.

- NOGUCHI, H. Comparative studies of *Herpetomonas* and *Leishmanias*. Differentiation of the organisms by serological reactions and fermentation tests. **Journal of Experimental Medicine**, v.44, p. 327-337. 1926.
- PARTHASARATHY, M.V.; SLOBBE, W.G.; SOUDANT, C. Trypanosomatid flagellate in the phloem of diseased coconut palms. **Science**, v.192, p.1346-1348. 1976.
- PETRY, K. et al. Use of monoclonal antibodies for differentiation of different isolates of *Phytomonas* (Plant tripanosomatids). **Journal of Phytopatology**, v. 126, p.56-68. 1989.
- PIZZA, M.; GIULIANI, M.; FONTANA, M. Mucosal vaccines: non-toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. **Vaccine**, v.19. p.2534-2541. 2001.
- REICHE, E. M. et al. Evaluation of the Western Blot in the confirmatory serologic diagnostic of Chagas' Disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.59, p.750-756. 1998.
- REED, S.G. et al. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**, v. 153, p. 3125- 3140. 1994.
- RUSSO, M. et al. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunology**; v.11, p. 385-395. 1989.
- SANTOS, R. R.; AMATO NETO, V.; GIOIA, I. Positividade de reações de fixação do complemento, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta, efetuadas com antígenos de *Leptomonas pessoai* e soros de pacientes com doença de Chagas. **Rev. Goiana Méd.**, v.21, p. 23-27. 1975.
- SCHNAPP, A.R. et al. Cruzipain induces both mucosal and systemic protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. **Infection and Immunity**, v.70, p.5065–5074. 2002.
- SCHMUNIS, G.A. *Trypanosoma cruzi* the etiologic agent of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and no endemic countries. **Tranfusion**, v. 31, p.547-557. 1991.
- SHI, W. et al. Papillomavirus pseudovirus: a novel vaccine to induce mucosal and systemic cytotoxic T lymphocyte responses. **Journal of Virology**, v. 75, p. 10139-10148. 2001.
- SILVA, A. C. et al. A 24,000 MW *Trypanosoma cruzi* antigen is a B cell activator. **Immunology**, v. 94, p. 189-196. 1998.
- SILVA, J. S. et al. Interleukin-10 and interferon-gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, p. 169-174. 1991.
- SILVEIRA, J.F.; UMEZAWA, E.S.; LUQUETTI, A.O. Chagas' disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 286-291. 2001.

SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SPINELLA, S.; MILON, G.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.. A CD4+ Th-2 cell line isolated from mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* induces IgG2 polyclonal response in vivo. **European Journal of Immunology**, v. 20, p. 1045-1051. 1990.

STAHEL, G. Zur kenntnis der slebrohrenkrankheit (phloemnekrose) des kaffeebaumes in Surinam. I- mikroskopische untersuchungem um infektionsversuche. **Phytopathology**, v. 4, p. 65-82. 1931.

TAFURI, W.L. Immunopathology of Chagas disease- A historical Overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 247-248. 1999.

TEIXEIRA, M.M.G.; CAMPANER, M.; CAMARGO, E.P. Characterization of the target antigens of *Phytomonas* specific monoclonal antibodies. **Journal of Microbiology**, v. 42, p. 232-237. 1995.

TEIXEIRA, M.M.G.; CAMARGO, E.P. Monoclonal antibodies for the identification of Trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. **Journal of Protozoology**, v.36. p.262-264. 1989.

TEIXEIRA, M.M.G.; SERRANO, M.G.; CAMARGO, E.P. New data from old Trypanosomatid preparations. **Parasitology Today**, v.16. p.261-263. 2000.

TELEMO, E.; KOROTKOVA, M.; HANSON, M.D. Antigen presentation and processing in the intestinal mucosa and lymphocyte homing. **Annals of Allergy, Ashtma and Immunology**, v. 90, suppl. 3, p. 28-33. 2003.

UMEZAWA, E. S. et al. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion*, v. 43, p. 91-97. 2003.

UMEZAWA, E. S.; DA SILVEIRA, J.F. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 285-288. 1999.

UTTARO, A.D.; SANCHES MORENO, M.; OPPERDOES, F.R. Genus-specific biochemical markers for *Phytomonas* spp. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 90, p. 337-342. 1997.

VATTUONE, N.H.; YANOVSKY, J.F. *Trypanosoma cruzi*. Agglutination activity of enzyme-treated epimastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 30, p. 49-55. 1971.

VERDOLIN, B. A. et al. Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 211-219. 2001.

VEXENAT, A.C.; SANTANA, J.M.; TEIXEIRA, A.R.L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) Braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 177-185. 1996.

VICKERMAN, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: LUMSDEN, W.H.R.; EVANS, D. **Biology of Kinetoplastida**, 1976.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the Trypanosomatid flagellates. **International Journal of Parasitology**, v. 24, p. 1317-1331. 1994.

VITTETA, E.S.; GUTTMAN, H.W. Immunological relationships among the lower Trypanosomatidae. **Journal of General Microbiology**, v. 48, p. 45-52. 1967.

WALLACE, F.G. Biology of the kinetoplastida of arthropods. In: LUMSDEN, W.H.R.; EVANS, D. **Biology of Kinetoplastida**. 1979.

WALLACE, F.G.; ROITMAN, I.; CAMARGO, E.P. Tripanosomatids of plants. In: KREIR, J.P.; BAKER, L.R. **Parasitic Protozoa**. 1992.

WEINER, H.L. Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 106, p. 935-937. 2000.

WEINER, H.L. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. **Immunology Today**; v. 18, p. 335-343. 1997.

WENION, C.M. **Protozoology**: a manual for medical mem, veterinarians and zoologists. 1926.

3. ARTIGO

Phytomonas serpens, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. Breganó, J.W.; Picão, R.C.; Graça, V.K.; Menolli, R.A.; Itow Jankevicius, S.; Pinge Filho, P.; Jankevicius, J.V. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2003.

4. ARTIGO Host and parasite factors influencing the immune cross-reactions between *Phytomonas serpens* and *Trypanosoma cruzi*

Rafael Andrade Menolli^a, Viviane Krominski Graça^a, José Wander Breganó^a, Alberto Durán González^a, Gisele dos Santos Carvalho^a, Jean Pierre S. Peron^b, Phileno Pinge Filho^b, Shiduca Itow Jankevicius^a, José Vitor Jankevicius^a

^a Laboratório de Tripanosomatídeos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil

^b Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil

ABSTRACT

The immune cross-reaction between *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease and *Phytomonas serpens*, a trypanosomatid parasite of tomatoes can be used for diagnostic and protective purposes in experimental murine models. *Phytomonas serpens* is available in various strains, cultivated from infected tomato fruits at various times and places, all with strong surface immune cross reactions with human chagas' disease sera. Two of them, 9T strain, reference species of *P. serpens*, and 15T, utilized for immunological studies, were compared in mice immunization experiments and both reduced significantly the parasitemia of *T. cruzi* lethal challenge but only 15T strain prolonged survival. With strains BALB/c and Swiss of mice, genetically sensible to *T. cruzi* infection, a reduction of parasitemia and a small delay of survival is obtained with the immunization with 15T strain of *P. serpens*, while with the mice strain C57BL/6, genetically resistant to *T. cruzi*, not only parasitemia practically disappear as the survival was obtained for months. These results corroborate the participation of genetic aspects of the parasite and of the host. Various molecules detected by Western Blot was not recognized by all human sera from Chagas' disease and Leishmaniasis patients as well normal sera, indicating variability in the immune recognition among the human individuals. These data denote that the immune cross-reaction is a complex task, with results depending on host and parasite characteristics.

INTRODUCTION

The Trypanosomatidae family comprises various important genera of parasite flagellates, mainly *Trypanosoma* and *Leishmania*. The protozoan *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* caused an human infection, endemic in Latin America, affecting more than 16 million people (1), where the transmission routes are progressively being controlled (2,3). The serological detection of serum antibodies to *T. cruzi* antigens has been the main method for the laboratory diagnosis of Chagas' disease (4, 5). The immune cross-reactions with serum from patients infected with other trypanosomatids (mainly *Leishmania*) and bacteria adversely affected the Chagas' disease diagnosis (6). Another genus of the family, *Phytomonas*, comprises plant parasites, affecting important crops as coconut and oil palms, coffee and cassava and a great number of edible fruits as tomato, apple, orange, guava, grape, mulberry, pineapple, plum, star fruit, and many others (7-10). Recently (11), it was demonstrated that *Phytomonas serpens*, a tomato parasite (12), is highly immunogenic, presenting strong immune reactivity with human sera from Chagas patients and partially protecting mice immunized and later challenged with a lethal inoculum of *T. cruzi*. As the immunization can be obtained by oral route (11) and *Phytomonas* naturally infected edible fruits are frequent, (13,14) a practical implication of the ingestion of infected fruits could be the potential priming of the immune response to *T. cruzi* antigens and the interference with the development and diagnosis of *T. cruzi* infection (11). Most of the contacts between human being and potential allergens occurred through mucosa and is where the main production of antibodies of the organism occurred (15). The production of immunoglobulins responsible by cross-reactions in serological tests could occur from contacts of mucosa with substances or microorganisms innocuous to humans but processed similarly to known pathogens (16). The antigenic relationships among Trypanosomatids are known, mainly between *T. cruzi* and *Leishmania sp* (17) but with the lower Trypanosomatids (including *Phytomonas*), although also known since a long time (18), is little studied (11, 19-21). Therefore, the consumption of edible fruits naturally infected by *Phytomonas* could lead to the development of an immune cross-reaction against pathogenic human parasites, that could interfere with the evolution of the pathologies associated, as the autoimmunity is still considered in Chagas' disease (22). The intense cross reactivity showed by trypanosomatids is object of many studies, mainly between the better-known *Leishmania* and *Trypanosoma*, routinely detected in clinical laboratories of countries endemic to both diseases, as the case of Brazil (17). Now the study of the antigenic relationship between the so-called lower trypanosomatids, parasites of insects and plants, and their famous relatives, always take place in the shadow of the search of vaccines for the diseases caused by *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. These studies were discontinued when verified that level of protection obtained was similar to the obtained with other forms of the parasites itself, though none produced sterile immunity (23). The present study pursues the knowledge of the basic conditions for this cross-reaction, relative to parasite (the influence of the strain of *Phytomonas serpens*), the host (the influence of strain of the mice immunized and challenged) and the molecules involved, (detected by Western blot with human Chagas sera)

MATERIALS AND METHODS

The Internal Scientific Commission and the Bioethics in Research Committee of the State University of Londrina, Paraná, Brazil reviewed and approved this study. All procedures with animals were in accordance with the Brazilian Code for the use of Laboratory Animals.

Trypanosomatids

Trypanosoma cruzi Y strain was kindly supplied by Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo, Institute of Biosciences (IB), Campinas State University (UNICAMP) and the CL strain, kindly supplied by Dr. Rubens Cecchini, Department of Pathological Sciences, Londrina State University (UEL), was maintained by serial passages in BALB/c mice. Blood containing trypomastigote forms was obtained from BALB/c mice 1 week after i.p. inoculation with 2×10^5 blood forms. For in vitro experiments, epimastigotes of Y strain were grown at 28°C in Liver Infusion Tryptose (LIT) medium (24) by serial passages every 5-7 days.

P. serpens strains 9T, 10T, 15T and 30T, all isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit (12) were cultured in Glucose, Yeast extract, Peptone and Meat Infusion (GYPMI) medium (25) at 28°C.

Human sera

As previously described (6,26) normal human sera or sera from patients with Chagas' disease were supplied by the Hemocenter of the Regional Academic Hospital of North Paraná (HURNP), State University of Londrina (UEL), Paraná, Brazil.

All sera were previously evaluated by three serological methods for Chagas' disease:

1) Qualitative indirect hemagglutination assay (IHA) with commercially available reagents (EBRAM, Produtos Laboratoriais Ltda., São Paulo, Brazil) at an initial serum dilution of 1:32.

2) Qualitative indirect immunofluorescence (IIF), carried out with fixed *T. cruzi* parasites on microscope slides (LIO serum, Indústria e Comércio de Equipamentos e Produtos para Laboratórios Ltda., Ribeirão Preto, Brazil) with an initial serum dilution of 1:40 and anti-human IgG conjugate (LABORCLIN Produtos para Laboratórios Ltda., Pinhais, Paraná, Brazil.) and

3) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas' disease with commercially available reagents (Abbott Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, Brazil). The presence or absence of antibodies to *T. cruzi* was determined by relating the optical density (OD) of the serum specimen to the cut-off value. A ratio between the sample OD and the cut-off OD value (sample OD/cut-off OD) was determined for each serum sample assayed.

A serum sample was considered positive for Chagas' disease when positive serologic results (IHA titer $\geq 1:32$, IIF titer $\geq 1:40$, and ELISA results higher than the cut-off value) were obtained in at least two different tests.

For Leishmaniasis, it was used:

1) Qualitative indirect immunofluorescence (IIF), using promastigote forms of *Leishmania braziliensis* or *Leishmania tropica* on commercially available microscope slides (LIO serum, Indústria e Comércio de Equipamentos e Produtos para Laboratórios Ltda., Ribeirão Preto, Brazil and ECON, São Paulo, Brazil). The fluorescein – conjugated goat anti-human IgG (LABORCLIN Produtos para Laboratórios Ltda., Pinhais, Paraná, Brazil. and The Binding Site Ltd., Birmingham, United Kingdom) used as a second antibody at an initial serum dilution of 1:20.

2) The Montenegro skin test was performed using commercially available antigens of *Leishmania braziliensis* or *L. donovani* promastigotes (Reagentes Biológicos Pimenta Abreu

Ltda., São Paulo, Brazil). The reactions were performed by injecting intradermally 0.1 mL of antigen into the forearm. The test was read 48-72 hr later and induration >5 mm was considered positive.

It was utilized three groups of human sera in the experiments:

Group I – thirty-five human sera with serological positive results for Chagas' disease, obtained from HURNP. Clinical symptoms of Chagas' disease are or not present in these patients.

Group II – thirty human sera from patients with clinical diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL), obtained from patients attended at the Ambulatory of Clinical Hospital of the State University of Londrina. These patients has active suggestive lesions, coming from endemic areas and with positive results for Leishmaniasis at least in one conventional laboratory test (IIF, Montenegro skin test or direct microscopy),

Group III – thirty-five normal human sera obtained from blood donors at Hemocenter of HURNP, with non reagent serological results for Chagas' disease, Leishmaniasis, Hepatitis C and B, HIV, HTLV and VDRL in conventional laboratory tests.

Direct agglutination test (DAT)

The promastigote culture forms of *P. serpens* strains were collected in the log phase growth in GYPMI medium, centrifuged and washed three times in 15 mM PBS, pH 7.2, followed by trypsin treatment of the parasites as described by Vattuone and Yanovsky (27). The final concentration of treated cells was adjusted to 1×10^7 cells mL⁻¹ and the suspension stained with 1% rose Bengal. The direct agglutination reactions were carried out on agglutination plates with "V" bottom wells using 20 µL of serum in two-fold dilution series with 20 mM PBS containing 10 mM β-mercaptoethanol, followed by the addition of 20 µL of the final parasite suspension, starting at 1:2 dilution. The plates were covered with contact film, mixed in a Kline shaker for 5 min, and incubated at 28°C. Readings were made with the unaided eye after 72 hr of incubation. A total of 60 normal human sera and 25 sera from patients with Chagas' disease were used in DAT assays with *P. serpens* antigens. The DAT titer was defined as the highest serum dilution that presented a positive agglutination pattern in relation to positive and negative serum controls.

Immunization of mice with *P. serpens* and challenge with *T. cruzi*.

As previously described (11), female BALB/c, Swiss and C57BL/6 mice aged 8-12 weeks were obtained from breeding colonies maintained at the Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo,

Brazil. The mice were maintained under standard conditions in the animal facilities of the Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Paraná, Brazil. For immunization of mice, living forms of *P. serpens*, collected at the log phase of growth were washed three times by centrifugation at 3000 x g for 5 min in 15 mM PBS, pH 7.2, and inoculated intra peritonally (i.p.). Each inoculum consisted of 2×10^8 living parasites per 0.1 mL in 15 mM PBS, pH 7.2, and was given four times at 1-week intervals. Seven days after the last immunization dose, the mice were infected i.p. with 10^5 Y or CL strain *T. cruzi* blood trypomastigotes (lethal doses) obtained from infected BALB/c mice. Blood parasites (parasitemia) were determined in 5 μ L of tail blood spread evenly between a slide and a cover slip under standard conditions and read under a 40 X light microscope objective (28). Parasitemia and survival rates were determined daily beginning on the 5th day after challenge.

Statistical analysis

Data were analyzed statistically using the INSTAT software (GraphPad, San Diego, USA). The results are expressed as mean \pm standard deviation of the values for 10 animals per group. Differences in parasitemia and overall analysis of serum samples were evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey-Kramer multiple comparisons test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Preparation of Trypanosomatids antigens

The antigens were derived from culture promastigote (*Phytomonas*) or epimastigote (*Trypanosoma*) forms. The cells were cultured in GYPMI or LIT medium, respectively, until exponentially growth phase and antigens for Western blot test were prepared as previously published (6, 26). Briefly, the cells were pelleted by centrifugation at 3,200xg for 10 min at 4°C, washed four times with 0,15 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2 by centrifugation at 3,200xg for 10 min at 4°C. The sediment was resuspended in sample buffer (0.125 M Tris-HCl, 4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% glycerol, 5% β -mercaptoethanol and 0.042% bromophenol blue, pH 6.8) and boiled for 5 min. The treated cell suspension was centrifuged at 3,200xg for 30 min at 4°C and the supernatant divided into aliquots and stored at -20°C up to the time of use in electrophoresis. Protein concentration in the antigenic suspension was determined by the Bradford method (29) using bovine serum albumin (BSA) as standard at 1,000 μ g/mL concentration..

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

The discontinuous SDS buffer system was used with slab gels with a 7.5-15.0% polyacrylamide gradient in the running gel of 8 cm high and 12 cm wide. The stacking gel was 5% acrylamide, used to fulfill the plate, and permits the construction of the sample lanes. After gel polymerization, samples of the parasite antigens preparations containing 100 μ g of protein equivalent per lane were applied to the gel. The molecular weight markers (Amesham Life Biosciences), from 10 to 250 kDa was applied to the gel.

The running buffer (0.025 M Tris-base, 0.92 M glycine and 0.1% SDS, pH 8.8) was added and the samples subjected to electrophoresis at 110V (25mA) until the stain front reached the bottom of the gel. The gel was stained with Coomassie brilliant blue R 250 for proteins at room temperature. The gel was then dried between two wet cellophane sheets and 10% gelatin (w/v) for about 72 hr at room temperature and the relative molecular mass (MWr) of each electrophoresed protein fraction was determined in relation to molecular weight

markers. The gels was also mounted in a protein transfer apparatus and subjected to electroimmunotransfer blotting.

Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot -Western Blot

This method was performed according to the procedure of Towbin and others (30), with some modifications (6, 26). The polypeptides in the polyacrylamide gels were transferred to nitrocellulose sheets (pore size = 0.45 μm – Gibco) at 200 mA, , 4°C and 14 hr in a Trans Blot apparatus (electrophoresis power supply EPS-600, Pharmacia Biotech). The nitrocellulose sheet was stained with Ponceau 0.1% to verify the protein transfer and the sheet was cut into vertical 5-mm strips. The strips are distained with 150mM PBS and than blocked with a solution of 5 % defatted (skim) milk (Molico, Nestlé, São Paulo, Brazil), 0.1% Tween 20 in PBS, pH 7.2, for 2 hr at room temperature with constant shaking. Then, rinsed with PBS and treated for 1 hr with serum samples diluted 1:80(to observe main recognized bands in chagasic and leishmaniotic sera) or 1:40 (to observe all proteic bands in normal human sera) in PBS containing 5% defatted milk and 0.1% Tween 20. Then, the strips were washed three times (10 min/wash) in PBS and treated for 1 hr with peroxidase-labeled rabbit anti-human total Ig (Sigma Chemical Co) diluted 1:500 in PBS pH 7.2 containing 5% defatted milk and 0.1% Tween 20 at room temperature. After three additional washes in PBS (10 min/wash), the color substrate (0.3% 4-chloro-1-naphtol in methanol dissolved in PBS and 30 % H_2O_2) was added. The color was allowed to develop for 15 to 30 min in the dark at room temperature until the appearing of colored bands. The strips were then rinsed in distilled water, dried, and photographed. The results were compared visually with positive (a pool of at least 3 well-known positive serum samples) and negative (normal sera) controls. Human serum was omitted in some nitrocellulose strips as a control for nonspecific binding of the conjugate to antigens.

RESULTS

Cross-reaction of *P. serpens* strains antigens with human chagasic sera.

Various *P.serpens* strains (9T, 10T, 15T and 30T) evaluated in surface immune cross-reaction with human chagasic sera (table 1) demonstrated that all of them have surface antigens demonstrable by the Direct Agglutination test. The presence of these antigens permits clear distinction of human chagasic sera from normal human sera. From these results, it was choosed the strains 15T and 9T as the most active in the detection of human sera with antibodies against *Trypanosoma cruzi*. When the titers of DAT are compared (Fig.1), the results of 9T and 15T antigens are essentially the same with the same group of human sera (25 chagasic and 65 normal sera) these antigens will be used in immunization experiments to evaluate the role in protection and pathogeny of experimental murine Chagas' disease.

Table 1

Frequency of DAT titers in Human sera positive and negative for Chagas' disease in conventional serology. Different strains of *Phytomonas serpens* were used as antigens. Thick vertical line represents cut of titer of the method (left, negative, right positive)

Strain of <i>P. serpens</i> antigen	human chagasic sera	Frequency (%) of DAT Titer					
		1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
9T	negative	15	38	33	13	0	0
	positive	0	0	4	28	52	16
10T	negative	5	38	45	12	0	0
	positive	0	0	8	64	28	0
15T	negative	2	37	55	6	0	0
	positive	0	0	0	28	60	12
30T	negative	17	50	28	5	0	0
	positive	0	0	12	36	40	12

25 positive human Chagas' disease sera and 65 normal human sera.

Parasitemia and survival of mice immunized with *Phytomonas serpens* and challenged with lethal inoculum of *Trypanosoma cruzi*.

Figure 2 show the parasitemia results of 20 BALB/c mice (2A), in each experimental group of immunization with the strains 9T and 15T of *Phytomonas serpens*, later challenged with lethal inoculum of CL strain of *T. cruzi*.

The parasitemia in both immunized groups of mice is clearly (and significantly) reduced in relation to the control (non immunized) group.

The same groups of animals were followed in their survival after lethal challenge with *T. cruzi*, with the results showed in figure 2B.

As seen, the mice immunized with the 9T strain of *P. serpens* did not present significant difference in survival rate in relation to control group, while the mice immunized with 15T strain have a significant lengthening of survival rate.

In figure 3, the results of parasitemia of Swiss strain mice (3A), known to be susceptible to *T. cruzi*, immunized with the 15 T stain of *P. serpens*, showed a significant reduction of parasitemia but the high numbers of parasites in the blood was followed by death of the animals.

In figure 3B, the survival of the animals of 3A is very similar to the figure 2A, of BALB/c mice, also susceptible to *T. cruzi*, immunized with 15T strain.

In figure 4A, the parasitemia of C57BL/6 strain mice, known to be resistant to *T. cruzi* infection, immunized with 15T strain of *P. serpens*, showed a marked reduction in the number of blood parasites, until been undetectable in the method used.

The figure 4B evaluate the survival of C57BL/6 mice of figure 4A, were up to 40% of immunized animals survived more than 6 months (period of observation) from the lethal inoculum of *T. cruzi*.

Detection of *Phytomonas serpens* antigens by human sera from normal individuals, chagasic and leishmaniotic patients trough Western blot

The electrophoretic profile obtained with the cellular extract of the 15T strain of *P. serpens* in the SDS-PAGE, demonstrated a large spectra of peptides, with at least 41 main proteic bands appearing in the numerous eletrophoretic runs, with apparent molecular mass between 10kDa and 253kDa.

Various antigens of *Phytomonas serpens* were recognized by the different sera groups, showing a great diversity of recognition among the groups.

The serum from the patients, Chagasic and Leishmaniotic, when used with the standardized serum dilution (1:80) showed a mean number of recognized fractions of 3.82 and 2.25, respectively. The tests realized with normal sera diluted 1:80, used as controls for Western Blot tests, did not detect significative bands. As we are looking for the patterns of protein fractions that could be recognized by normal sera, from uninfected people eventually immunized by *Phytomonas serpens* naturally infected tomato fruits, we utilized a lower dilution that enabled visualization of more bands recognized by normal sera, which showed a mean number of recognized fractions of 4.93.

Western blot results from Chagas' disease patients sera with 15T strain *P. serpens* antigens.

All sera of this group recognized at least one proteic band of *P. serpens* antigen and it was a predominance of antigenic bands with lower molecular mass, with prominence for two ranges of peptides bands. One of them, with the range of 21 kDa to 30 kDa of 15T strain *P. serpens* antigens, was recognized by 64.7% of the human chagasic serum samples, while the other near range, from 31kDa to 40 kDa, was recognized by 50% of the serum samples tested. With individual bands, the fraction of 24 kDa was recognized by 20,6% of the chagasic serum samples, while the 30 kDa fraction was recognized by 26,5% of the serum samples tested. (Table 2).

Western blot results from Leishmaniasis patients sera with 15T strain *P. serpens* antigens

With Leishmaniasis patients, 3 sera (8.57 %) recognized none band of 15T strain *P. serpens* antigens. With the serum from leishmaniasis patients, the results were more homogeneous than with Chagas' disease, with bands regularly distributed in the ranges of molecular mass, with the greater number of sera (34.3 %) recognizing antigens of the range of 21 kDa to 30 kDa, while 31.4% of sera recognized antigens of the range 51 kDa to 60 kDa. As the Leishmaniotic serum samples had a more homogeneous recognition pattern, only one fraction, with 30 kDa, has a higher prominence, with 14,3% of serum samples (Table 2).

Western blot results from normal individuals sera with 15T strain *P. serpens* antigens

With normal sera, it was utilized a lower dilution (1:40) than the utilized with the Chagas' disease and Leishmaniasis human sera (1:80). Interestingly, it was found a great reactivity with the *P. serpens* antigen, with all normal sera recognizing at least one band. The profile showed by these sera were different from the others (Chagas' disease and Leishmaniasis), with prominence of polypeptide bands of higher molecular mass, in the range of 81 kDa to 90 kDa, were 80 % of normal sera recognized some antigen of the range. In the range of polypeptides higher than 91 kDa, 73.3% of the normal sera present positive results. Also, although in lower dilution (1:80), what is highly significant, the normal sera did not recognize the fractions of 24 kDa and 30 kDa, recognized by human Chagasic and Leishmaniotic sera. Although present in low percentual of the sera analyzed, these antigens could be specific and diagnostic to Chagas disease and Leishmaniasis. Interestingly, the antigens in the range of 81kDa – 90kDa, recognized by normal sera diluted 1:40 but not by patient's sera diluted 1:80, which did not interact with the fractions of 81, 83 and 85kDa of *P.serpens* cell extract.

Table 2

Apparent molecular mass of proteic fractions of <i>P. serpens</i>	Leishmaniotic human sera	Chagasic human sera	Normal human sera
17	-	8.8	3.3
18	2.9	8.8	-
22	2.9	11.8	-
24	8.6	20.6	-
25	2.9	14.7	-
26	-	8.8	6.7
29	5.7	11.8	-
30	14.3	26.5	-
31	8.6	-	3.3
32	-	14.7	-
33	-	5.9	23.3
35	-	17.6	3.3
38	5.7	-	10.0
39	-	2.9	23.3
50	2.9	14.7	3.3
53	2.9	14.7	-
68	5.7	11.8	6.6
71	2.9	-	16.6
73	2.9	5.9	10.0
74	-	-	13.3
76	2.9	-	10.0
81	-	-	20.0
83	-	-	30.0
84	8.6	-	-
85	-	-	26.6
87	-	2.9	13.3
102	-	-	13.3
108	-	-	10.0
110	-	-	10.0
133	-	-	16.7
250	-	14.7	-

Table 2 – Frequency (%) of recognition of proteic fractions by leishmaniotic, chagasic and normal sera in the western blot test with *Phytomonas serpens* antigen. Chagasic and leishmaniotic sera diluted to 1:80 and normal sera diluted to 1:40. Apparent molecular mass of proteic fractions expressed as kiloDaltons (kDa).

Detection of *T. cruzi* and *P. serpens* antigens by sera from chagasic patients.

It was utilized *T. cruzi* antigens for comparisons with the *P. serpens* antigens with Chagas' disease human sera. The *T. cruzi* antigens in the range of 21 kDa to 30 kDa were recognized by 100% of Chagas' disease patients sera and the next range (31 kDa to 40 kDa) was also recognized by 93.1% of the sera. Another clear aspect is, as with *P. serpens* antigens, the lower ranges of molecular mass of *T. cruzi* antigens, present the greater quantity of proteic bands recognized by the analyzed Chagas' disease patients sera, (although in lower percentage), demonstrating a certain antigenic relationship between *T. cruzi* and *P. serpens* antigens (Table 3).

Table 3
Comparisons of recognition of proteic bands of *P. serpens* and *T. cruzi* in Western blot with human chagasic sera.

Apparent molecular mass of proteic fractions (kDa)	<i>Tryp</i>	<i>Phyto</i>
	<i>anosoma cruzi</i> antigen	<i>monas serpens</i> antigen
19	17.2	8.8
22	17.2	11.8
24	35.7	20.6
25	35.7	14.7
26	24.1	8.8
29	31,0	11.8
30	6.9	26.5
31	24.1	-
32	14.7	20.7
35	31.0	17.6
37	27.6	2.9
39	20.7	2.9
46	3.4	11.8
50	3.4	14.7
53	6.9	14.7
68	10.3	11.8
73	17.2	5.9
81	10.3	-
105	10.3	-
250	-	14.7

Table 3,
Table 3 – Frequency (%) of recognition of proteic fractions by chagasic human sera in the Western blot test against *Phytomoans serpens* and *Trypanosoma cruzi* cellular extracts. The chagasic sera diluted 1:80. The apparent molecular mass expressed as kiloDaltons (kDa).

DISCUSSION

The existence of immune cross-reactivity between *Phytomonas serpens* and *Trypanosoma cruzi* was already described (11) and the present study evaluate the conditions for the cross immunity between them.

The first variable analyzed was the strain of *Phytomonas serpens*. By definition, *P. serpens* are the trypanosomatid parasites of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) (9). Among various strains (9T, 10T, 15T and 30T) of *P. serpens*, isolated from tomato fruits in various times and localities in Brazil (12-14), all of them showed strong immune cross-reaction with human chagasic sera in a direct agglutination test (table 1), involving surface antigens been recognized by Chagas' disease antibodies. We elect two strains, 9T, considered reference strain for *Phytomonas serpens* (14) and 15T, used for immunological studies of cross reaction (11), for further comparisons. The results of comparisons of DAT titers present results almost identical between strains 9T and 15T (fig 1). The results of all taxonomic criteria used (12-14) was identical for both strains. The results of parasitemia and survival using immunized BALB/c mice and challenge with CL strain of *T. cruzi* showed a significant reduction of parasitemia in both strains of *P. serpens* but only 15T was able to lengthening the survival to lethal inoculum of *T. cruzi* (fig. 2). This result demonstrates that although similar in many aspects (14), the strains can differ in the capacity to prolong the survival after lethal *T. cruzi* challenge. It could be attributed to genetic differences in some proteins involved in the immune cross-reaction. The host also has genetic aspects controlling the resistance and sensibility to *T. cruzi* infection (31). The influence of the strain of the host was evaluated with the infection of Swiss mice, known to be sensible to Chagas' disease with 15T strain of *P. serpens*. The results (Fig. 3) are essentially as with mice strain BALB/c (also susceptible), that is, significant lowering of parasitemia and slight elongation of survival. With the mouse C57BL/6, a strain genetically resistant to *T. cruzi* infection, the parasitemia was dramatically reduced in the *P. serpens* immune mice, who also survived for more than 6 months (period of observation) to lethal *T. cruzi* challenge.(Fig.4) Both experiments permit to conclude that genetic aspects are evolved in the cross-reactivity between *T. cruzi* and *P. serpens* and the capacity to resist to *T. cruzi* infection is heritable by host. The immunization with *P. serpens* only stimulates the pre-existing immune capacity and hosts susceptible (BALB/c and Swiss) continued to be susceptible, only slightly less sensible, when immunized with *P. serpens*. The immunization with *P. serpens* stimulates the host immune response to antigens shared with *T. cruzi*, who protects the resistant host strains against lethal challenge. The problem of identification of the shared antigens was approached by the Western blot technique. The interest was also to show which molecules present in the *P. serpens* antigenic extracts would be recognized by sera from human Chagas' disease and Leishmaniasis patients. As expected, the results of SDS-PAGE electrophoreses show a complex pattern of proteins in the cell extract of *P. serpens*, with at least 41 proteins with molecular mass from 10 to 253 kDa. When submitted to Western blot, sera from Chagas' disease patients have greater reactivity than sera from Leishmaniasis patients with the cell extract of *P. serpens*. This kind of observation was already being done with other antigenic extracts (6, 27) and appears to be characteristic of the diseases, independent of the antigens used in the detection of immunity. This could be due to higher likeness of *T. cruzi* with *P. serpens* than *Leishmania* with *P. serpens*. This is corroborated by the fact that some proteins of *T. cruzi*, as Ca⁺⁺-binding proteins (CaBP), was found in *P. serpens* but not in human *Leishmanias* (32).

The characterization of antigens of *Phytomonas serpens* has been done with specific monoclonal antibodies. (33) Using living cells and labeling surface proteins, it was identified an 80kDa surface glycoprotein, specifically detected in the genus *Phytomonas* (33). The proteic fractions in the range of 80-90 kDa recognized by normal sera diluted 1:40 in the cell

extract of *P.serpens* (Table 2) could be this specific surface glycoprotein. As antigen specific to *Phytomonas*, it was not recognized by Chagas' disease sera in the *P.serpens* extract (table 3). The presence of antibodies recognizing this antigen, specific to *Phytomonas*, in human normal sera diluted 1:40 showed that is plausible to think that this recognition of *P. serpens* antigens could be the result of a natural immunization by the ingestion of infected tomato fruits. The recognition of antigens in the range of 20-30 kDa by Chagasic sera and in lower frequency by Leishmaniasis sera could be attributed to the Ca⁺⁺-binding proteins (CaBP), present in *Trypanosoma cruzi* and *Phytomonas serpens* and absent in *Leishmania* (33)

The identification of the main molecules involved in this process is a difficult task because, first, none of the antigens of *P. serpens* is recognized by all of the positive Chagas' disease or Leishmaniasis patients' sera. This was also observed with other antigenic systems (6, 27). It could be due to the individual characteristics of processing antigens (MHC, genetic profiles) in a manner that each individual "see" the molecules of the parasites in different form. The Western blot technique, when used based in a bidimensional electrophoresis, revealed a much more complex protein picture, with, for example, various proteins with the same relative molecular mass and at least four different isoelectric points (preliminary results not shown). Interestingly, the tendency to use individual recombinant proteins for laboratory diagnosis (34) was substituted by the use of mixtures of recombinant proteins, demonstrating once more the complexity of host-parasite interactions (35). The knowledge of the molecules evolved in the cross reaction between *P. serpens* and *T. cruzi* could lead to utilization of processes as immunizations or standardization of diagnostic methods, mainly with molecular biology technology, starting with a more safe biological material not infective to man, with rapid, easy and cheap growing in a simple culture medium.

BIBLIOGRAFY

- WHO – World Health Organization Tropical disease research: progress report 95 96. 134 p. Geneve.1977.
- SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. **Rev. Soc.Bras.Med.Trop.** v. 27(supl. 3), p 11-22. 1994.
- SCHMUNIS, G. A. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin América. Mem. **Inst.Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 93-101. 1999
- BRENNER, Z.; KRETTLI, A. U. Immunology of Chagas' disease. In: Wyller,DL (1990) Modern Parasite Biology. Celular, immunological and molecular aspects. Freeman, **WH and company New York**, p.247-261.1990
- CAMARGO, M. E. Serological diagnosis: an appraisal of Chagas' disease serodiagnosis. In: WENDEL, S. et al. Chagas' disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil 92 São Paulo, Brazil p.165-178. 1992
- REICHE, E. M, et al.. Evaluation of the Western blot in the confirmatory serologic diagnostic of Chagas's Disease. Am.J. Trop. Med. Hyg., v. 59, p.750-756. 1998.
- DOLLET, M; GENTY, P.; OLLANNIER, M Control preventive de la "Marchitez sorpressiva" de *Ellais guineensis* en America Latina. Oléagineux 30, 243 250.1975.
- VAINSTEIN, M.H.; ROITMAN, I. Cultivation of *Phytomonas françai* associated with poor development of root system of cassava. J.Protozool. v. 33, p. 511-513. 1985.
- WALLACE, F. G.; ROITMAN, I.; CAMARGO, E. P. Trypanosomatids of plants. In: Parasitic Protozoa, vol. 2 (Kreier, JP and Barker, JR, eds.) p.55-84 Academic Press, San Diego,CA. 1992.
- CAMARGO, E. P. Phytomonas and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. Adv. in Parasitol. v. 42, p. 29-112. 1999.
- BREGANÓ, J. W. *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. 2003.
- JANKEVICIUS, J.V. et al. The life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a tripanosomatid parasite of tomatoes. J. Protozool., v. 36, p. 265-271. 1989.
- FERNÁNDEZ-RAMOS, C Biochemical characterization of flagellates isolated from fruits and seeds from Brazil. FEMS Microbiol.Lett. 170,343 348.1999.
- CATARINO, L. M. et al. Classification of trypanosomatids from fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates. FEMS Microbiology Letters 201, p. 65 72. 2001.

TELEMO, E.; KOROTKOVA, M.; HANSON, M.D. Antigen presentation and processing in the intestinal mucosa and lymphocyte homing. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 90 suppl. 3. p. 28-33. 2003.

EGINAT, G. et al. enhancement of the *Listeria monocytogenes* p60-specific CD4 and CD8 cell memory by nonpathogenic *Listeria innocua*. *J. Immunol.* v. 162,p. 4781-4789. 1999.

VEXENAT, A. C.; SANTANA, J. M., TEIXEIRA, A. R. L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) Braziliensis*. *Rev. Inst. Méd. Trop. de São Paulo*, 38: 177-185. 1996.

NOGUCHI, H. Comparative studies of Herpetomonas and Leishmanias. Differentiation of the organisms by serological reactions and fermentation tests. *J. Exp. Med.*, v. 44, n.3, p. 327-337. 1926.

SOUZA, M. C. et al. Mechanism of acquired immunity induced by *Leptomonas pessoai* against *T. cruzi* in mice. *J. Protozool.* v. 21, p. 579-584.

SANTOS, R. R.; AMATO NETO, V.; GIÓIA, I. Positividade de reações de fixação de complemento, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta, efetuadas com antígenos de *Leptomonas pessoai* e soros de pacientes com doença de Chagas. *Rev. Goiana Med.*, v. 21, p. 23-27. 1975.

LOPES, J.D. et al. 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. 1981.

KERSZENBAUM, F. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* V. 37, p. 1-11. 2003.

KIERSZENBAUM, F. Chagas disease. In: *Vaccination strategies of tropical disease* (Liew, F.Y, Ed.), p.173-195 CRC Press Boca Raton, FL. 1989.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. 1. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Méd. Trop. de São Paulo*, v.6, p. 93-100. 1964.

ITOW JANKEVICIUS, S. Axenic cultivation of trypanosomatids found in corn (*Zea mays*) and Phytophagous Hemipterans (*Leptoglossus zonatus*, Coreidae) and their experimental transmission. *J. Euk. Microbiol.*, v. 40, p. 576-581. 1993.

GONÇALVES, C. C. M. et al. 2002. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a western blot for diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 66, p. 91-102.

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

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. São Paulo, *Rev. Inst. Med. Trop.*, v. 4, p. 389-396. 1962.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 2, p. 248-254. 1976.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Science of USA*, 76: 4350-4354. 1979.

TRISCHMANN, T. M.; BLOOM, B. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 35: 546-551. 1982.

MALDONADO, R.A. et al. Homologues of the 24-kDa flagellar Ca²⁺-binding protein gene of *Trypanosoma cruzi* are present in other members of the Trypanosomatidae family. *Exp. Parasitol.* v. 86, p. 200-205. 1997.

TEIXEIRA, M. M. G.; CAMPANER, M.; CAMARGO, E. P. Characterization of the target antigens of *Phytomonas* -specific monoclonal antibodies. *J.Euk.Microbiol.* 42,232-237. 1995.

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

UMEZAWA, E. S. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion*, 43: 91-97. 2003.

FIGURE 1

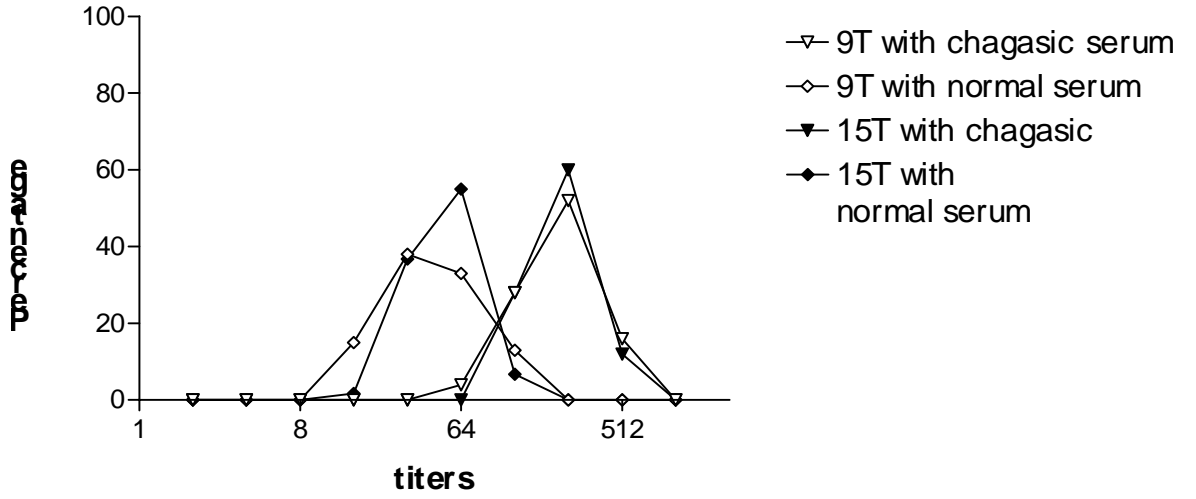


FIGURE 2

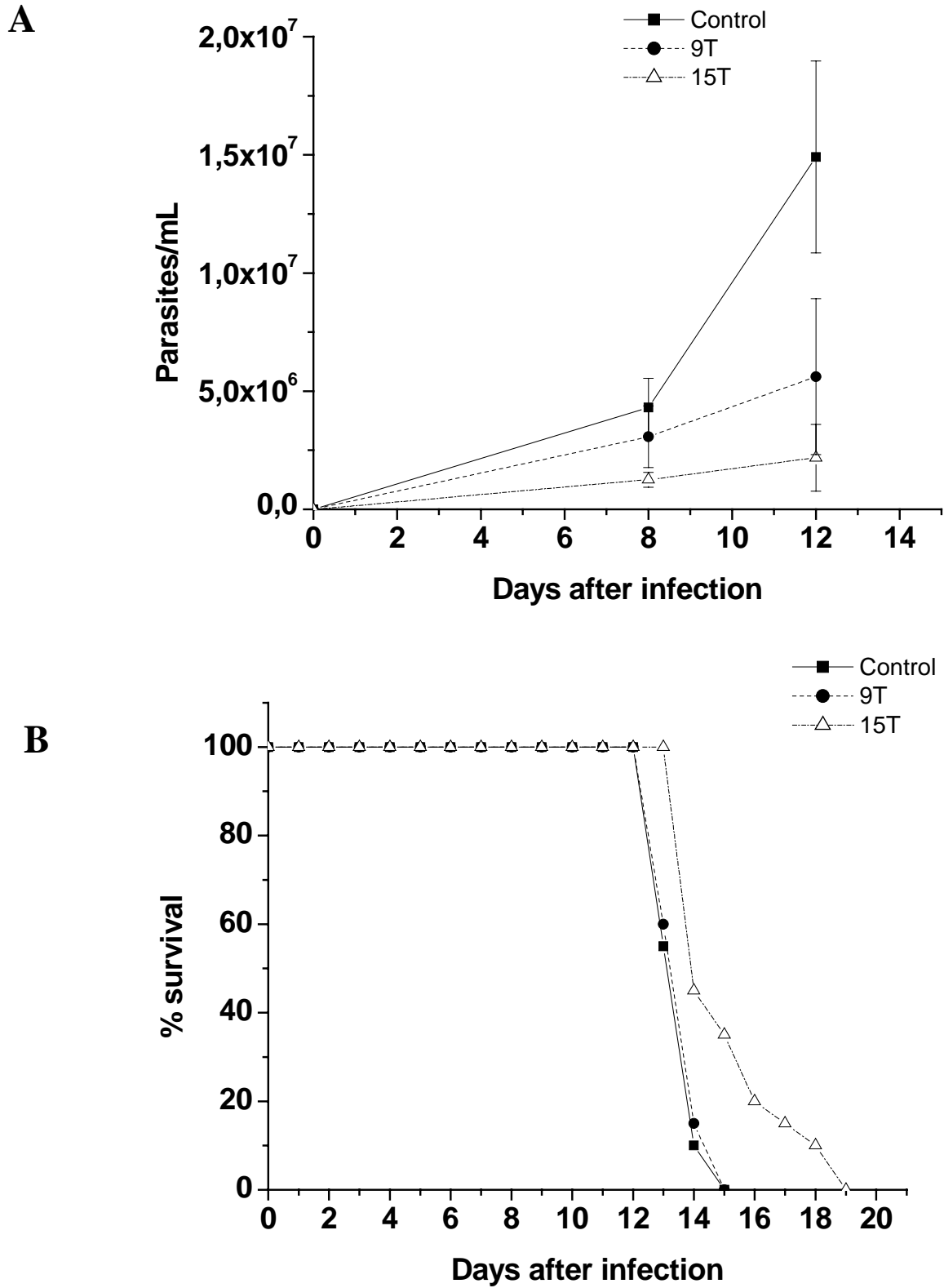
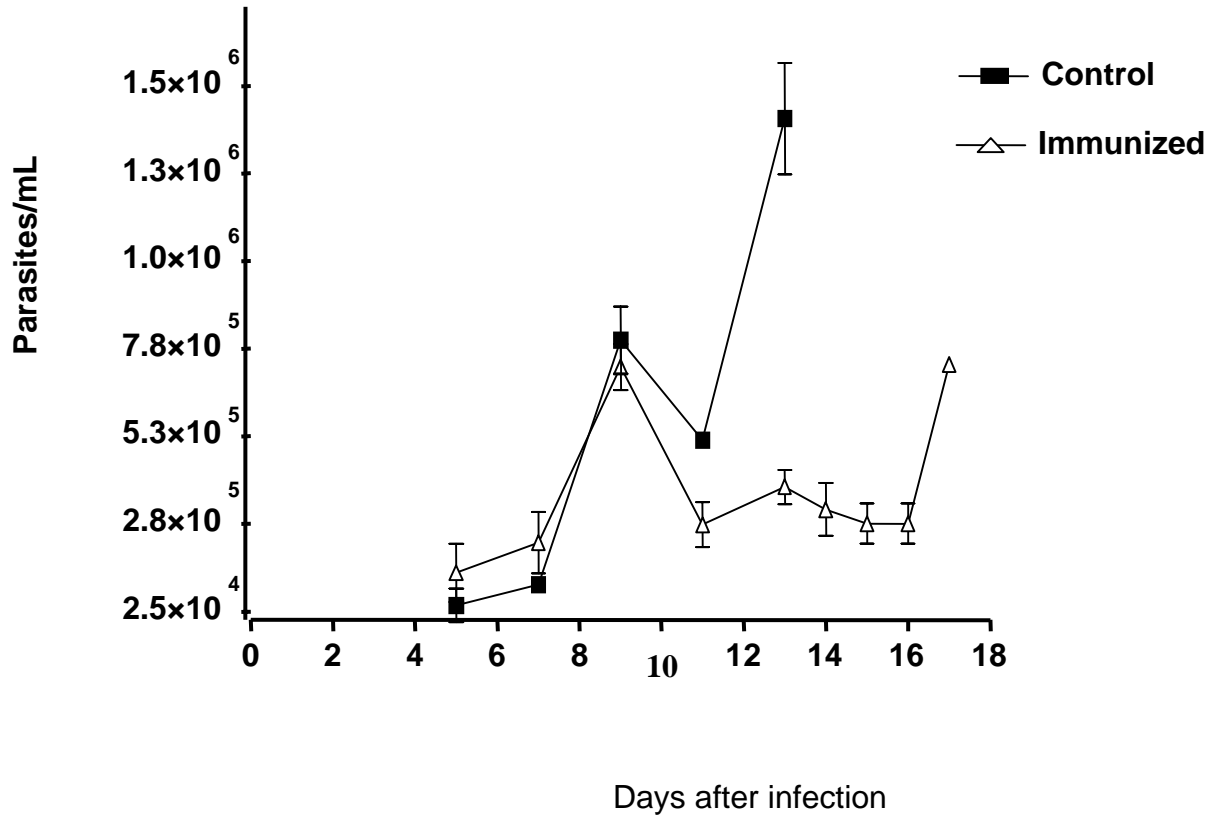
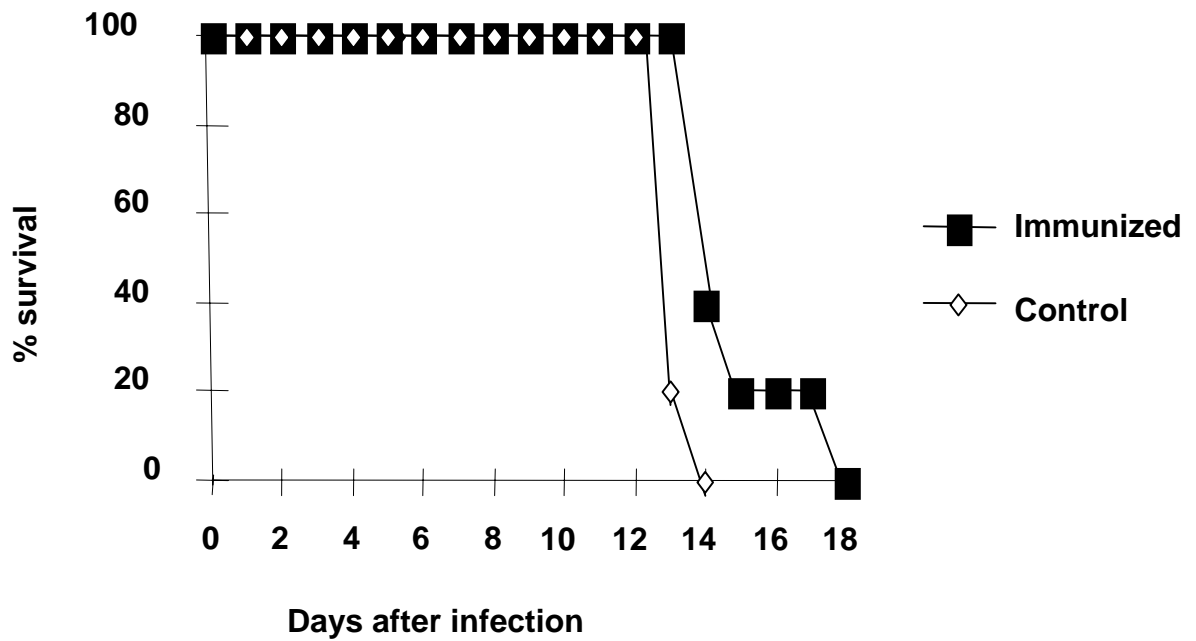


FIGURE 3

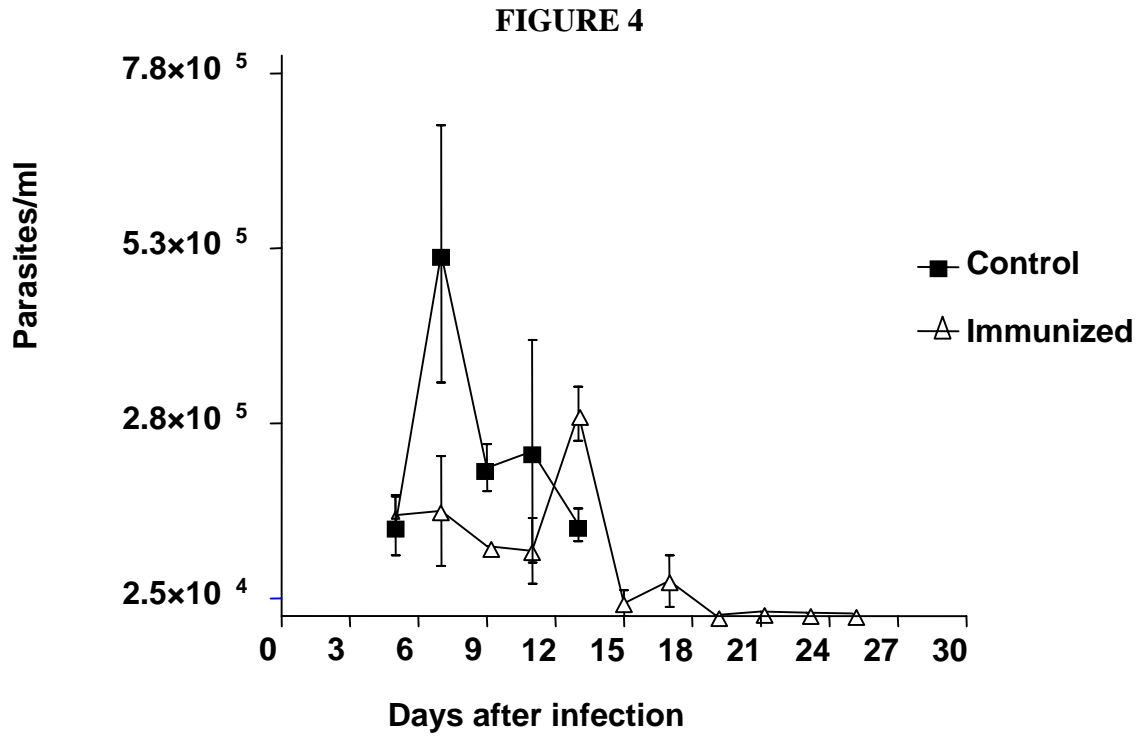
A



B



A



B

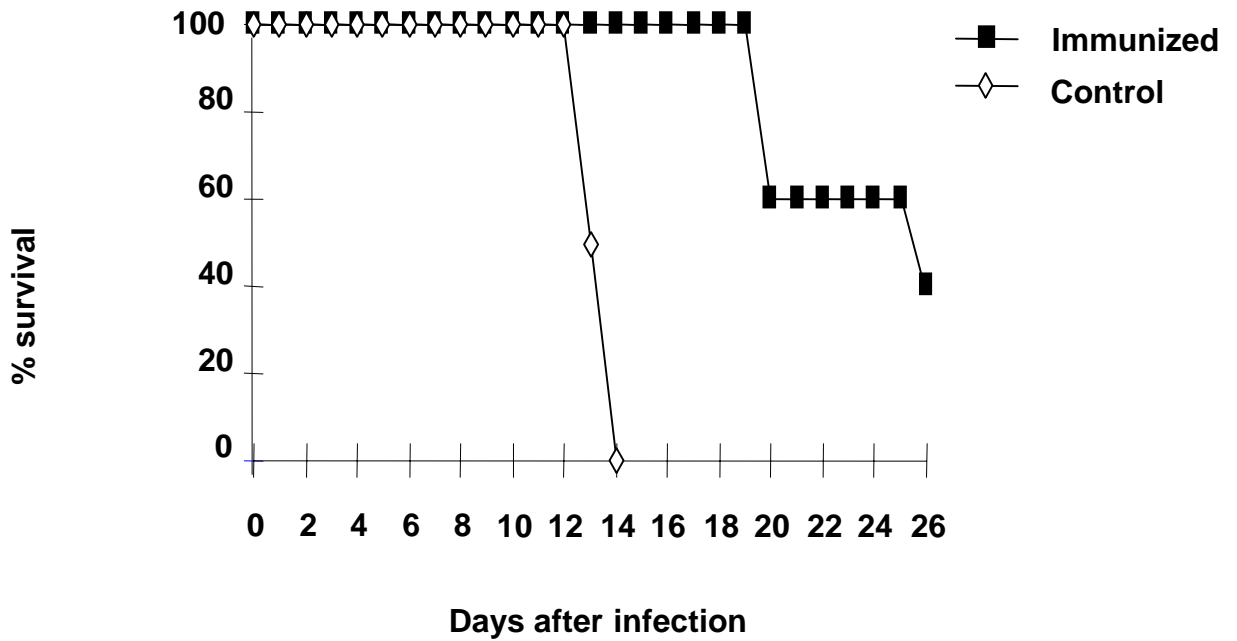


FIGURE 1 – Frequency (%) of titers of DAT with Chagas' disease and normal human sera using 9T and 15T antigens.

FIGURE 2 – parasitemia (A) and survival (B) of BALB/c female mice, between 8 and 12 weeks of age, immunized with *Phytomonas serpens*, 9T and 15T strains, and challenged with 10^5 CL strain *Trypanosoma cruzi* blood forms.

FIGURE 3 – parasitemia (A) and survival rate (B) of Swiss female mice, between 8 and 12 weeks of age, immunized with *Phytomonas serpens*, 15T strain, and challenged with 10^5 Y strain *Trypanosoma cruzi* blood forms.

FIGURE 4 – parasitemia (A) and survival rate C57BL/6 female mice, between 8 and 12 weeks of age, immunized with *Phytomonas serpens*, 15T strain, and challenged with 10^5 Y strain *Trypanosoma cruzi* blood forms.

5. DISCUSSÃO FINAL

A interação entre patógenos e hospedeiros leva a inúmeros eventos desencadeados principalmente pelos contatos molécula-molécula, que interagindo vão determinar o sucesso da infecção pelo parasita ou seu debelamento pelo hospedeiro. Nos caso de infecções que levam a infecções crônicas, caso dos protozoários *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Plasmodium*, as conseqüências de uma infecção são inúmeras para o sistema imunológico, que podem ser de uma imunossupressão a uma proliferação desenfreada de imunógenos.

O mecanismo que cada parasita exerce para driblar o sistema imune normalmente é conhecido da literatura, mas os meios de se evitar a propagação através de vacinas ainda não e isso leva em conta principalmente a capacidade que esses protozoários tem de se evadir do sistema imunológico.

No caso do *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas, a sua capacidade em provocar uma infecção crônica leva a formação de um grande número de anticorpos inespecíficos que invariavelmente provocam reações cruzadas inespecíficas em testes sorológicos, principalmente com outro parasita da família Trypanosomatidae a *Leishmania sp.*, o que levou a procura de testes cada vez mais sensíveis e específicos para evitar os falsos positivos e negativos, principalmente através de purificação de antígenos do próprio *T. cruzi* e de técnicas de proteínas recombinantes para obtenção dos antígenos procurados.

A procura por estes antígenos também passou pela descoberta de uma semelhança antigênica com outros tripanosomatídeos, chamados inferiores, parasitas de plantas e insetos, usados também na tentativa de imunizações contra a Doença de Chagas, mas logo descartadas pelos resultados serem semelhante aos que vinham sendo obtidos com outras técnicas.

A presença de inúmeros frutos que podem ser contaminados com *Phytomonas serpens* e ser consumidos *in natura* fazem com que a exploração entre a relação de uma

possível imunização natural com esses protozoários e a já sabida relação antigênica entre eles e o *T. cruzi* torne-se alvo de pesquisa.

O interesse em tripanosomatídeos de plantas aumenta quando verificado que a imunização por via oral é efetiva e pode ser determinante na proteção contra uma infecção letal pelo *T. cruzi*, o que comprova a presença de antígenos comuns entre esses dois parentes da família Trypanosomatidae, o que não chega a surpreender, mas mais interessante é que nível de proteção conseguiu-se atingir com as imunizações oral e intraperitoneal realizadas com o parasita de tomate *Phytomonas serpens*.

A pergunta que poderia ser feita seria se a ingestão de frutos comestíveis contaminados com *P. serpens* poderia levar a um baixo título de anticorpos capazes de interferir numa reação cruzada com *T. cruzi* em testes sorológicos ou mesmo na evolução da patogênese da Doença de Chagas.

Os mecanismos que levam a essa reação imune cruzada não estão esclarecidos mas fatores envolvendo os microorganismos e os hospedeiros estão envolvidos, e quando testados dois isolados diferentes de *P. serpens*, apesar de bioquimicamente e filogeneticamente idênticos, imunologicamente apresentaram um comportamento diferente frente ao *T. cruzi*, deixando claro que essa relação tem uma sintonia fina quando relacionado a antígenos semelhantes, com a imunização com um isolado protegendo mais do que a proteção provocada pelo outro isolado.

A diferença entre hospedeiros pode ser comprovada usando-se modelos murinos experimentais, utilizando linhagens resistentes e susceptíveis, fica mais evidente que os aspectos genéticos dessa resistência e/ou susceptibilidade são reforçados pela presença da imunização com *P. serpens* mas não são capazes de alterar o padrão de resistência, aumentando um pouco a resistência em camundongos susceptíveis e tornando a linhagem mais resistente ainda mais resistente.

Ao transportar essa visão para o universo humano podemos perceber que, com um teste capaz de identificar não somente a reação cruzada mas as possíveis moléculas envolvidas, dentro do universo de pacientes com Doença de Chagas e Leishmaniose cada um responde de uma maneira aos parasitas e conseqüentemente na produção de anticorpos a eles, que reflete na reação imune cruzada com o *P. serpens*, que apesar de não definir quais seriam as moléculas envolvidas nessa reação, explicitam a individualidade de cada hospedeiro frente aos mesmos microorganismos, podendo ser explicado em parte pelo processamento e apresentação via MHC que promove um repertório diferente pra cada indivíduo. Isso poderia explicar a maior ou menor susceptibilidade ao *T. cruzi*, e até mesmo a patogênese por ele desencadeada envolvendo questões como a autoimunidade na Doença de Chagas, uma vez que somente 30% dos portadores da Doença de Chagas desenvolvem sintomas clínicos, e também a possível interferência causada por uma ingestão de frutos contaminados com *P. serpens*. Esta hipótese toma corpo quando avaliada a presença de reconhecimento de antígenos de *P. serpens* em ensaios de Western Blot de soros normais, que mostraram novamente a individualidade de cada hospedeiro e também a possível imunização passiva causada por uma ingestão de frutos infectados, aventando para uma possível interferência não só na evolução da doença de Chagas, mas também em testes sorológicos de maior sensibilidade.

A procura por antígenos cada vez mais específicos para os testes sorológicos de infecções crônicas passa por problemas como, por exemplo, que nenhum paciente chagásico reconhece os mesmos antígenos que outro e isso impede a utilização de antígenos individualizados para testes sorológicos e faz com que a busca por proteínas recombinantes, através da biologia molecular, se dê no encaço de pool de antígenos que poderiam alcançar maior sensibilidade e especificidade. Essa busca poderia se utilizar de antígenos de *P. serpens*, que por serem inócuos ao ser humano, de mais fácil manutenção em meios de cultura

simples e crescimento rápido são uma ótima opção para a padronização de testes diagnósticos para a Doença de Chagas.