Caracterização imunoquímica de antigénios com reatividade serológica cruzada em tripanosomatídeos (*Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp.)

Joana Duarte de Oliveira Fontes Frazão

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Biológica

Orientador(es): Professor Investigador Marcelo de Sousa da Silva

Professor Doutor Gabriel António Amaro Monteiro

Júri

Presidente: Professor Doutor Duarte Miguel de França Teixeira dos Prazeres

Orientador: Doutor Marcelo de Sousa da Silva

Vogal: Professora Doutora Maria Ângela Cabral Garcia Taipa Meneses de Oliveira

Março 2016

Agradecimentos

Ao meu orientador Doutor Marcelo Sousa Silva, pelos ensinamentos e a orientação prestada durante esta investigação e sobretudo pela confiança depositada e pelo acolhimento no Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Gabriel António Amaro Monteiro.

Ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical que me acolheu e a todos os funcionários desta instituição, nomeadamente do Biotério, que direta ou indiretamente permitiram a concretização deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho e amigos dos últimos meses que contribuíram não só com os seus conhecimentos mas também para um excelente ambiente de trabalho nomeadamente, ao Jailson Brito Querido, à Janine Domingos, à Joana Monteiro, à Sónia Pestana, à Daniela Portugal, à Adriana Temporão, à Catarina Henriques, à Filipa Ferreira, à Cláudia Moreno e à Dra. Lina Antunes. Um agradecimento especial à Joana Monteiro e à Sónia Pestana por todo o acompanhamento prestado e pela paciência e dedicação durantes as inúmeras horas de trabalho.

A todos aqueles que estão presentes na minha vida, os meus amigos de sempre, Inês, Rita, Ana, Tomás, Maria, Mafalda, Rita e Paulinha com quem sei que posso sempre contar e que foram cruciais na fase final deste percurso.

Um obrigado especial à minha (grande) família por tudo aquilo que representam e pela união que nos caracteriza. Aos meus avós, aos meus tios e aos meus primos que tiveram sempre uma palavra de apoio nos momentos mais difíceis desta jornada, que me incentivaram em todos os momentos e que num último esforço tornaram possível a apresentação deste trabalho que coincidiu com uma das fases mais difíceis da minha vida.

À Inês pela presença assídua durante todo este percurso, pelo apoio, pela amizade, pela companhia e pelas horas de paciência e partilha durante os momentos mais complicados.

Aos meus pais pela resiliência, paciência, dedicação e carinho, por acreditarem em mim.

Ao André, pelo apoio incondicional, pela compreensão e preocupação constantes, pela amizade, pelo carinho, pelo amor e por todos os momentos ao meu lado.

Muito obrigada a todos ☺

Resumo

Trypanosomatidae é um grupo protozoários pertencente à ordem Trypanosomatida, onde se inserem os géneros de importância médica: Trypanosoma e Leishmania. Estes géneros incluem os parasitas *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, agentes etiológicos da Leishmaniose, doença de Chagas e doença do sono, respetivamente, classificadas como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

Os métodos de diagnóstico utilizados até ao momento para deteção destas doenças são essencialmente testes serológicos, onde muitas vezes ocorrem reações cruzadas, uma vez que existe partilha de antigénios entre as três populações de tripanosomatídeos. Neste sentido, com este trabalho, pretendeu-se caracterizar e identificar antigénios dos três tripanosomatídeos (*Leishmania* spp.,*T. cruzi e T. brucei*) responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da imunidade humoral durante as fases de infeção e envolvidos na reatividade serológica cruzada e específica (anti-*Leishmania* spp., anti-*T. cruzi* e anti-*T. brucei*) das diferentes populações. Para tal, foram utilizadas amostras de soros de murganhos experimentalmente infetados e de humanos e canídeos naturalmente infetados com um dos três tipos de tripanosomatídeos.

Os resultados obtidos após caracterização e cruzamento dos soros policlonais produzidos demonstraram a existência de reatividade serológica cruzada essencialmente entre as quatro espécies de *Leishmania* em estudo e entre *T. cruzi* Y e *T. b. brucei*. Relativamente à caracterização e identificação de antigénios, foram identificados alguns antigénios com reatividade cruzada, destacando-se os antigénios de massa molecular de aproximadamente 88, 77, 75, 25 e 20 kDa.

Posteriormente, a realização de uma análise *in silico* permitirá a identificação das proteínas destacadas no contexto deste estudo e poderá contribuir para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico.

Palavras-chave: *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, Leishmaniose, Doença de Chagas, Doença do sono, Reatividade cruzada.

Abstract

Trypanosomatidae is a group of protozoa belonging to Trypanosomatida order, where the genres of medical importance *Leishmania and Trypanosoma* are inserted. These genres include parasites *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*, etiologic agents of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness, respectively classified as Neglected Tropical Diseases (NTDs) by the World Health Organization (WHO).

The diagnostic methods used so far for the detection of these diseases are essentially serological tests, where cross-reactions often occur, since there are antigens shared among the three populations of trypanosomatids. In this sense, this work aimed to characterize and identify antigens of the three trypanosomatids (*Leishmania spp*., *T. cruzi* and *T. brucei*) responsible for the development and maintenance of humoral immunity during the stages of infection and involved in serological cross-reactivity and serological specific reactivity (anti-*Leishmania* spp., anti-*T. cruzi* and anti-*T. brucei*) of different populations. To this end, samples of experimentally infected mice sera and of naturally infected human and canine, with one of three types of trypanosomatids, were used.

The results obtained after characterization and crossing of the polyclonal antisera produced, demonstrated the existence of serological cross-reactivity essentially between the four species of *Leishmania* studied and between *T. cruzi* Y and *T. b. brucei*. In what regards the characterization and identification of antigens, there have been identified some antigens with cross-reactivity, where the antigens with molecular weight of approximately 88, 77, 75, 25 and 20 kDa have special relevance.

Later, by conducting an analysis *in silico,* it should be possible to identify the proteins highlighted in the context of this study and there could contribute for the development of new diagnosis methods.

Key-words: *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei,* Leishmaniasis, Chagas Disease, Sleeping sickness, cross-reactivity.

Índice

Página

Agradecimentos III

Resumo V

Abstract VII

Índice IX

Lista de Figuras XI

Lista de Tabelas XIII

Lista de Abreviaturas XV

Capítulo 1 – Introdução 1

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas 1

1.2 Família Trypanosomatidae 1

1.3 Mecanismos de resposta imune 2

1.3.1 Resposta imune humoral 3

1.3.2 Resposta imune celular 5

1.4 Tripanosomatídeos causadores de Leishmaniose 6

1.4.1 Ciclo de Vida de *Leishmania* spp. 6

1.4.2 Epidemiologia e distribuição geográfica 7

1.4.3 Aspetos Clínicos da leishmaniose 8

1.4.4 Mecanismos de resposta imune frente à leishmaniose 8

1.4.5 Diagnóstico da leishmaniose 9

1.4.5 Tratamento da leishmaniose 10

1.5 Tripanosomatídeos causadores de Doença de Chagas 10

1.5.1 Ciclo de Vida de *Trypanosoma cruzi* 11

1.5.2 Epidemiologia e distribuição geográfica 11

1.5.3 Aspetos Clínicos da doença de Chagas 13

1.5.4 Mecanismos de resposta imune frente à doença de Chagas 13

1.5.5 Diagnóstico da doença de Chagas 14

1.5.6 Tratamento da doença de Chagas 15

1.6 Tripanosomatídeos causadores de Tripanossomose Africana 15

1.6.1 Ciclo de Vida de *Trypanosoma brucei* 16
1.6.2 Epidemiologia e distribuição geográfica 17
1.6.3 Aspetos Clínicos da tripanossomose africana 18
1.6.4 Mecanismos de resposta imune frente à tripanossomose africana 18
1.6.5 Diagnóstico da tripanossomose africana 19
1.6.6 Tratamento da tripanossomose africana 20
Capítulo 2 - Objetivos 21
Capítulo 3 - Materiais e Métodos 23
3.1 Animais 23
3.2 Parasitas 23
3.3 Cultura axénica de *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* Y 24
3.3.1 Cultura de *Leishmania* 24
3.3.2 Cultura de *Trypanosoma cruzi* Y 25
3.4 Infeção de Murganhos com *Trypanosoma brucei brucei* para produção de extrato proteico total 25
3.5 Obtenção do extrato proteico total dos diferentes tripanosomatídeos 25
3.5.1 *Leishmania e Trypanosoma cruzi* Y 25
3.5.2 *Trypanosoma brucei brucei* 25
3.6 Determinação da concentração proteica dos extratos dos diferentes tripanosomatídeos 26
3.7 Produção de anticorpos policlonais monoespecíficos através de imunização de murganhos da linhagem Balb/C 26
3.8 Caracterização dos anticorpos policlonais monoespecíficos anti-tripanosomatideos 27
3.9 Caracterização antigénica da reatividade serológica específica e cruzada entre os diferentes tripanosomatídeos 28
Capítulo 4 – Resultados e Discussão 31
4.1 Determinação dos títulos de anticorpos dos diferentes soros policlonais monoespecíficos 31
4.2 Reatividade serológica cruzada entre os diferentes anticorpos policlonais 34
4.3 Caracterização dos antigénios envolvidos na reatividade serológica específica e na reatividade serológica cruzada entre os diferentes tripanosomatídeos 38
Capítulo 5 – Conclusões e Perspetivas Futuras 47
Capítulo 6 – Referências Bibliográficas 49
Capítulo 7 – Anexos 57

Lista de Figuras

Figura 1 - Classificação taxonómica de *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei.* 2
Figura 2 - Representação esquemática dos principais mecanismos de defesa do sistema imunitário. 3
Figura 3 - Representação estrutural de um antigénio [12]. 4
Figura 4 - Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral e respetivas espécies de *Leishmania* ssp.. 6
Figura 5 - Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Adaptado de [21]). 7
Figura 6 - Distribuição geográfica das zonas endémicas de leishmaniose [5]. 8
Figura 7 - Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (Adaptado de [52]). 11
Figura 8 - Rotas de migração a partir da América Latina e estimativa do número total de indivíduos infetados em países não endémicos para a doença de Chagas [55]. 12
Figura 9 - Regiões endémicas da doença de Chagas. 12
Figura 10 - Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei* (Adaptado de [85]). 16
Figura 11 - Distribuição dos casos de THA em África (Adaptado de [86]). 17
Figura 12 – *Trypanosoma brucei* em sangue humano observado por microscopia eletrónica de varrimento [100] (Créditos de imagem: Science Photo Library). 19
Figura 13 - Purificação das formas sanguíneas de *T. b. brucei* (Retirado de [129]). 32
Figura 14 - Reatividade especifica dos anticorpos policlonais anti-*Leishmania* spp. produzidos frente aos respetivos extratos. A - *L. amazonensis*; B - *L. guyanensis;* C - *L. infantum;* D - *L. shawi;* Respetivos controlos negativos representados a preto. 33
Figura 15 - Reatividade especifica dos anticorpos policlonais anti-*T.cruzi* e anti-*T. b. brucei* produzidos frente aos respetivos extratos. A – *Trypanosoma cruzi Y*; B – *Trypanosoma brucei brucei*; Respetivos controlos negativos representados a preto. 34
Figura 16 - Reatividade cruzada e específica dos anticorpos policlonais anti-*Leishmania* spp. frente aos extratos de *Leishmania* spp. A – Extrato *L. amazonensis*; B – *Extrato L. guyanensis*; C – Extrato *L. infantum*; D – Extrato *L. shawi*; Respetivos controlos negativos representados a preto. 35
Figura 17 - Reatividade cruzada e específica dos anticorpos policlonais anti-*T.cruzi* e anti-*T. b. brucei* frente a cada um dos extratos. A – Extrato *T. cruzi* Y; B – Extrato *T. b. brucei;* Respetivos controlos negativos representados a preto. 36
Figura 18 - Reatividade cruzada dos policlonais anti-*Leishmania* spp, anti-*T. cruzi* e anti-*T. b. brucei* frente a cada um dos extratos parasitários. A – *L. amazonensis*; B – Extrato *L. guyanensis;* C – Extrato *L. infantum*; D – Extrato *L. shawi*; E – Extrato *T. cruzi* Y; F – Extrato *T. b. brucei;* Respetivos controlos negativos representados a preto. 37
Figura 19 – Resultados das reações de *immunoblotting* nas membranas revestidas com extrato de *Leishmania* spp. M – marcador de massas moleculares; C^+ - controlo positivo; Tira 1, 2 e 3 – Soros de infeção por *L. infantum*; Tira 4, 5 e 6 – Soros de infeção por *T. cruzi*; Tira 7 e 8 – Soros de infeção por *T. b. brucei*; C^- - controlo negativo. 39

Figura 20 - Resultados das reações de *immunoblotting* nas membranas revestidas com extrato de *T. cruzi* Y e *T. b. brucei*. M – marcador de massas moleculares; C^+ - controlo positivo; Tira 1, 2 e 3 – Soros de infeção por *L. infantum*; Tira 4, 5 e 6 – Soros de infeção por *T. cruzi*; Tira 7 e 8 – Soros de infeção por *T. b. brucei*; C^- - controlo negativo..... 40

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais propriedades das cinco classes de imunoglobulinas. 4
Tabela 2 - Composição do gel de poliacrilamida a 10%. 28
Tabela 3 – Proteínas antigénicas detetadas nos extratos proteicos de *Leishmania* spp. pelos controlos positivos e soros de infeção por *L. infantum*. 41
Tabela 4 – Proteínas antigénicas detetadas nos extratos proteicos de *T. cruzi* Y *e T. b. brucei* pelos controlos positivos, soros de infeção por *T. cruzi* e soros de infeção por *T. b. brucei.* 43
Tabela 5 – Proteínas antigénicas detetadas nos extratos proteicos de *Leishmania* spp. pelos soros de infeção por *T. cruzi* e nos extratos proteicos de *T. cruzi* e *T. b. brucei* pelos soros de infeção por *L. infantum.* 44

Lista de Abreviaturas

ACF	Adjuvante completo de Freund
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIF	Adjuvante incompleto de Freund
APCs	*Antigen Presenting Cells* (Células Apresentadoras de Antigénios)
APS	Persulfato de Amónia
BCA	*Bicinchoninic Acid Protein*
BSA	*Bovine Serum Albumin* (Albumina de soro bovino)
CATT/T	*Card Agglutination Test for Trypanosomiasis*
CDC	*Center for Disease Control and Prevention*
CRA	Antigénio citoplasmático repetitivo
CTLs	*Cytotoxic T lymphocyte* (Células T citotóxicas)
DAB	*Diaminobenzidine* (Diaminobenzidina)
DCs	*Dendritic cells* (Células Dendríticas)
DMSO	*Dimethyl sulfoxide*
D.O	Densidade ótica
DTN	Doenças tropicais negligenciadas
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
FRA	Antigénio flagelar repetitivo
GPI	*Glycosylphosphatidylinisotol* (Glico-fasfatidil-inositol)
gp63	Glicoproteína de 63kDa
ICT	*Immunochromatographic test* (Teste imunocromatográfico)
IFN	*Interferon* (Interferão)
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ISG	*Invariant Surface Glycoproteins* (Glicoproteínas invariáveis de superfície)
LC	Leishmaniose cutânea
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LIT	*Liver Infusion Triptose*
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
MHC	*Major Histocompatibility Complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)
m/v	Relação massa/volume
NK	Células *natural killer*

OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	*O-Phenylenediamine dihydrochloride*
PBS	*Phosphate Buffer Saline* (Tampão fosfato salino)
PKDL	Leishmaniose dérmica pós-kala-azar (*Post-kala-azar dermal leishmaniasis*)
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	*Sodium dodecyl sulfate* (Dodecil sulfato de sódio)
SDS-PAGE	*Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*
TA	Tripanossomose Africana
TAD	Teste de aglutinação direta
TESA	*Trypomastigote excreted-secreted antigens*
Th	Células T *helper*
THA	Tripanossomose Humana Africana
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TNF	*Tumor Necrosis Factor* (Fator de necrose tumoral)
Ts	Células T supressoras
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VSG	*Variant Surface Glycoprotein* (Glicoproteínas Variáveis de Superfície)
v/v	Relação volume/volume

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

Em 2006, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs a classificação das doenças tropicais em três categorias: globais, negligenciadas e mais negligenciadas. Esta classificação representa uma evolução em relação à denominação anterior (doenças tropicais), uma vez que contempla os contextos de desenvolvimento político, económico e social [1].

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) são um grupo diverso de doenças com características distintas, que se desenvolvem principalmente em regiões tropicais e subtropicais, onde muitas vezes impera a pobreza, designadamente nos Continentes Africano, Asiático e América Central e do Sul. As dezassete DTN consideradas prioritárias pela OMS são endémicas em 149 países e afetam mais de mil milhões de pessoas, contribuindo não só para um impacto negativo na saúde como também para um ciclo continuado de pobreza [2].

A etiologia das DTN é diversa, podendo estas ser causadas por uma variedade de agentes patogénicos, tais como protozoários (Leishmaniose, Doença de Chagas e Tripanossomíase Africana), vírus (Dengue e Hidrofobia), bactérias (Úlcera de Buruli, Lepra, Tracoma e Treponematoses endémicas) e helmintas (Cisticercose, Dracunculíase, Equinococose, entre outras). Uma particularidade das DTN em estudo é o facto de os seus agentes etiológicos pertencerem à mesma família taxonómica: Trypanosomatidae [2].

1.2 Família Trypanosomatidae

Trypanosomatidae (Doflein 1901) é uma família de protozoários pertencente à ordem *Kinetoplastida* (Honiberg 1963), integrada no filo *Sarcomastigophora* e subfilo *Mastigophora*, que inclui protozoários flagelados [3]. A principal caraterística da sua morfologia é uma mitocôndria modificada repleta de ADN, designada de cinetoplasto, a qual intervém ativamente na locomoção destes seres, sendo este o ponto de inserção do flagelo [4].

Dos nove géneros que constituem esta família, cinco são monoxenos, estando por isso, restritos a um hospedeiro (invertebrado) e os restantes compreendem parasitas heteroxenos, ou seja, capazes de intercalar o seu ciclo de vida entre dois hospedeiros, em particular, invertebrados e vertebrados (*Trypanosoma, Leishmania, Endotrypanum*) ou entre plantas (*Phytomonas*) [5]. Apenas os géneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, representados na Figura 1, são de importância médica, uma vez que são os únicos capazes de infetar humanos [6].

Um fenómeno conhecido e descrito entre tripanosomatídeos, desde a década de 60, é a partilha de antigénios. Em 1969 foi confirmada a presença de imunoreatividade cruzada entre *T. cruzi* e *Leishmania* [7]. Em particular, a imunoreatividade cruzada entre tripanosomatídeos de importância médica é bem demonstrada na literatura e apresenta-se confirmada por diferentes metodologias de imunodiagnóstico [7–10].

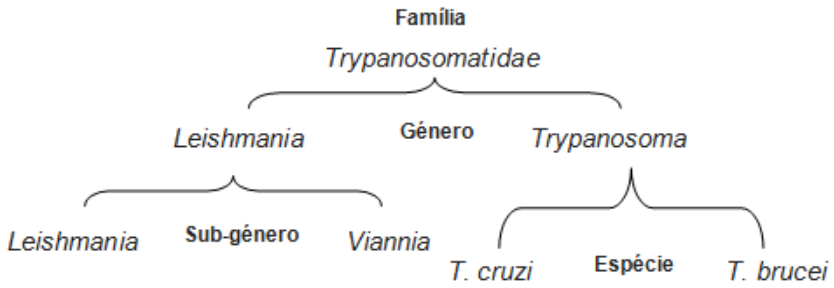

Figura 1 - Classificação taxonómica de *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei.*

Neste sentido e com base nos trabalhos já publicados, será feita uma caracterização imunoquímica de antigénios com reatividade serológica especifica e cruzada entre os diferentes tripanosomatídeos, com a possibilidade de utilização destes antigénios no desenvolvimento de testes de diagnóstico serológico para a leishmaniose, doença de Chagas e tripanossomose africana. Adicionalmente, estes antigénios poderão ser utilizados no desenvolvimento de protótipos vacinais.

1.3 Mecanismos de resposta imune

O sistema imunitário compreende uma rede complexa de órgãos, células e moléculas responsáveis pela manutenção da homeostasia do organismo. É sobretudo nos órgãos linfoides que são desencadeadas as respostas imunológicas, estabelecendo-se assim, um sistema eficiente capaz de proteger o organismo contra invasores do exterior [11].

Os linfócitos ocupam um papel central neste sistema, uma vez que conferem a especificidade das respostas imunológicas. Existem duas grandes famílias de linfócitos: linfócitos B e T. Os linfócitos B residem nos órgãos linfáticos periféricos (tais como baço, gânglios linfáticos, amígdalas e apêndices) e estão envolvidos principalmente na produção de anticorpos, tendo também capacidade de apresentar antigénios a outras células do sistema imunitário. Os linfócitos T têm esta designação pelo facto de a sua maturação ocorrer no timo (órgão linfoide primário). São as principais células da imunidade celular e contemplam três subtipos: auxiliares, citotóxicos e reguladores/supressores [12].

Outros tipos de células como macrófagos, células dendríticas (DCs), fibroblastos e células endoteliais e moléculas como anticorpos, proteínas do sistema complemento, citocinas e quimiocinas, são igualmente importantes de referir, uma vez que estão também envolvidas e fazem parte desta rede de interações.

A ativação do sistema imunitário inicia-se com a interação dos componentes do sistema imune com o agente considerado estranho, denominado de antigénio. Após uma primeira interação, os antigénios são processados pelas células apresentadoras de antigénios, que expõem na sua superfície partes destes, possibilitando o seu reconhecimento pelos linfócitos. Geralmente, os antigénios são proteínas ou polissacarídeos que podem existir livres (por exemplo toxinas) ou na superfície de microrganismos invasores (como bactérias e vírus).

O processo de formação de uma resposta imune eficiente frente às agressões sofridas pelo organismo pode, então, ser dividido em dois tipos de respostas inter-relacionadas e funcionalmente definidas, como representado na Figura 2. Estes dois tipos de resposta são denominados de sistema

imune inato ou natural, que apresenta uma especificidade de largo espectro e sistema imune adaptativo ou adquirido, cuja especificidade tem um caráter restrito [12].

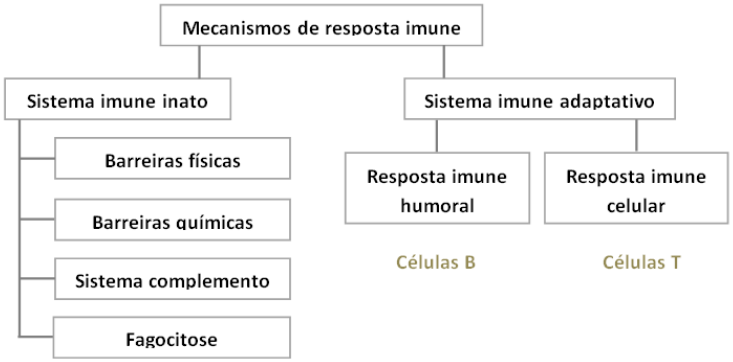

Figura 2 - Representação esquemática dos principais mecanismos de defesa do sistema imunitário.

O sistema imune inato está presente em todos indivíduos imunologicamente saudáveis, constituindo a primeira linha de defesa contra as agressões externas. As componentes envolvidas neste tipo de imunidade incluem: barreiras físicas (pele, membranas e mucosas), barreiras químicas (suco gástrico, enzimas digestivas, etc.), células fagocíticas e ativação do sistema complemento (independente de anticorpos). Estas integram como principais células efetoras, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células NK (*natural killer*). Estas últimas são fundamentalmente responsáveis pelo reconhecimento e lise de células infetadas por vírus, bactérias, protozoários ou células tumorais [11–13].

Por outro lado, o sistema imune adaptativo surge depois de uma exposição prévia ao antigénio ou agente infecioso. Quando, após a entrada de um agente agressor, a resposta inflamatória não é suficiente para o localizar, neutralizar ou eliminar, estabelece-se uma resposta imunológica adaptativa. Esta conta com a geração de anticorpos específicos (resposta imune humoral) e/ou produção de células efetoras, capazes de reconhecer e atacar as células portadoras de antigénios estranhos (resposta imune celular) [12,13].

1.3.1 Resposta imune humoral

A resposta imune humoral é mediada por anticorpos, que são proteínas globulares denominadas de imunoglobulinas que, por sua vez, são produzidos e secretados pelos linfócitos B, que têm como função principal, a neutralização e eliminação do antigénio contra os quais foram gerados.

Cada molécula de imunoglobulina (Ig) é constituída por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves ligadas por pontes dissulfito. Existem cinco tipos de cadeias pesadas denominadas α, δ, ε γ e μ, que determinam e classificam as imunoglobulinas em IgA, IgD, IgE, IgG e IgM respetivamente e cujas propriedades se encontram sumarizadas na Tabela 1. As classes de anticorpos IgA e IgG podem ainda ser divididas em subclasses, como IgA1 e IgA2 e IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 [14].

Tabela 1 - Principais propriedades das cinco classes de imunoglobulinas.

Classe	Propriedades
IgA	Geração de imunidade de mucosa contra vírus e bactérias Encontrada em mucosas do trato respiratório e gastrointestinal Presente também na saliva e no leite materno [14,15]
IgD	Imunoglobulina de membrana Recetor de antigénio nas células B *naïve* [14]
IgE	Envolvida em processos alérgicos Interação com basófilos e mastócitos, causa libertação de histamina [14]
IgG	Imunoglobulina principal da imunidade adquirida Opsonização de antigénios para fagocitose por macrófagos e neutrófilos Ativação do sistema complemento Presente no sangue e espaços intercelulares dos tecidos [13]
IgM	Imunoglobulina secretada precocemente na resposta imune adquirida Confinada ao sangue e ao sistema linfático Ativação do sistema complemento Recetor de antigénio nas células B *naïve* [13,16]

Estruturalmente, o antigénio é constituído por duas regiões (Figura 3), a especificidade de ligação e reconhecimento do antigénio é definida pela região $F(ab)_2$, considerada a componente principal do anticorpo. A segunda região do anticorpo é denominada Fc e, para além de determinar o isotipo do anticorpo, está envolvida em vários mecanismos efetores do sistema imunitário [17].

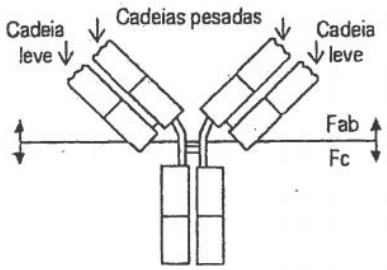

Figura 3 - Representação estrutural de um antigénio [12].

A resposta isotípica dos anticorpos é fundamental em diferentes mecanismos efetores da resposta imune e inclui mecanismos de neutralização de antigénios, citotoxicidade celular mediada por anticorpos, opsonização, fagocitose e ativação do sistema complemento. Estes são frequentemente utilizados e podem reforçar a ação citotóxica dos linfócitos T [13,17]. Para que estes mecanismos se iniciem, os linfócitos B devem ser ativados, o que implica um processo de proliferação e diferenciação. Este culmina na geração de plasmócitos, com produção de imunoglobulinas com alta afinidade para o epítopo antigénico que originou a resposta [14].

1.3.2 Resposta imune celular

A resposta imune celular (ou resposta imune mediada por células) está essencialmente associada aos linfócitos T, macrófagos e outras células apresentadoras de antigénios e serve como mecanismo de defesa contra microrganismos que sobrevivem e se multiplicam dentro de fagócitos ou células não fagocíticas [13]. O processo da resposta imune mediada pelos linfócitos T envolve a ativação de linfócitos T *naïve,* que proliferam e, se diferenciam em células efetoras e, consequentemente, são capazes de eliminar os microrganismos. Estes mecanismos são controlados pelos três tipos de linfócitos T já referidos, denominados de linfócitos T auxiliares ou *helper* (Th) $CD4^+$, linfócitos T supressores/reguladores (Ts) e linfócitos T citotóxicos (CTLs) $CD8^+$ [12].

A resposta imunológica adquirida a microrganismos que residem dentro de fagócitos, é mediada por linfócitos T $CD4^+$ efetores, denominados Th1, que reconhecem antigénios microbianos e ativam os fagócitos a destruir os microrganismos ingeridos [13]. O processo de resposta inicia-se pelo reconhecimento e processamento de um antigénio pelas células apresentadoras de antigénio (APCs) (células dendríticas, macrófagos, células B). Estas células expõem os fragmentos peptídicos obtidos após degradação proteolítica na sua superfície, em associação com uma classe de moléculas denominadas de MHC (*Major Histocompatibility* Complex) [12]. A formação do complexo antigénio-MHC é capaz de ativar células T *naïve* com o fenótipo $CD4^+$ que, ao reconhecerem na superfície de outras células este complexo, iniciam um fenómeno de proliferação e aumento do número de células T $CD4^+$ capazes de reconhecer especificamente o antigénio.

Por outro lado, a ativação das células T $CD4^+$ pelo antigénio possibilita o desenvolvimento de uma variedade de mecanismos imunitários. Por meio de produção e secreção de uma variedade de citocinas, os linfócitos T estimulam a função e evidenciam a atividade de células efetoras inespecíficas da imunidade natural, como os fagócitos, convertendo essas células em agentes da imunidade adquirida e ajudando na produção de anticorpos pelos linfócitos B [12,13,18].

No caso dos linfócitos T $CD8^+$ citotóxicos, após o reconhecimento da célula-alvo (por exemplo, células tumorais, células infetadas com vírus, microrganismos), são libertados grânulos líticos, sendo este o principal mecanismo pelo qual esta população de linfócitos exerce a sua função. Estes grânulos contêm dois tipos de enzimas - granzimas e perforinas - capazes de invadir a membrana das células-alvo, levando à fragmentação do seu ADN e à indução da via de morte celular programada (apoptose) [12].

Por último, os linfócitos T supressores/reguladores são reconhecidos pela sua capacidade em suprimir respostas imunológicas específicas [12]. Inibindo a atividade dos Ths e CTLs, estes modulam a resposta imunitária, apresentando um contributo importante na manutenção da autotolerância imunológica e no controlo das respostas autoimunes [14].

As respostas imunes mediadas pelos linfócitos T a um determinado antigénio, resultam habitualmente na geração de linfócitos T de memória específicos para esse mesmo antigénio. Estes podem derivar de linfócitos T $CD4^+$ ou $CD8^+$ em vários estágios de diferenciação de percursores naïves e são mantidos pela ação de citocinas como IL-7 e IL-15. Estes, quando novamente em contato com o antigénio, são responsáveis pela geração de respostas mais rápidas e amplificadas [13].

Em todos estes processos, para além das células já mencionadas, existem ainda diversas moléculas e mediadores solúveis (como citocinas, quimiocinas, entre outras) envolvidos numa rede de interações e que atuam como sinais de comunicação entre as várias células do sistema imunitário.

1.4 Tripanosomatídeos causadores de Leishmaniose

Leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários flagelados do género *Leishmania* e transmitida pela picada de flebotomíneos pertencentes à ordem *Diptera*, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, do género *Lutzomyia* (no Novo Mundo) ou *Phlebotomus* (no Velho Mundo) [19]. Este protozoário infeta inúmeras espécies de mamíferos, incluindo humanos, tornando a leishmaniose uma das principais doenças transmitidas por insetos nos países em desenvolvimento [5].

O género *Leishmania* divide-se em dois subgéneros: *Leishmania* e *Viannia*, como representado na Figura 4. Dentro destes, são conhecidas atualmente mais de 30 espécies de *Leishmania*, das quais 20 são patogénicas para o ser humano [5] e responsáveis pelas três formas clínicas da doença: leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC). A forma visceral é causada pela infeção por *L. donovani* ou *L. infantum/chagasi*. No caso da manifestação cutânea, esta é causada por espécies do velho mundo (*L. major, L. tropica, L. aethiopica*) e por várias espécies do novo mundo (*L. amazonensis, L. braziliensis, L. guyanensis e L. shawi*). Por sua vez, a forma mucocutânea é causada essencialmente por espécies do Novo Mundo, como *L. braziliensis* e *L. panamensis* [20].

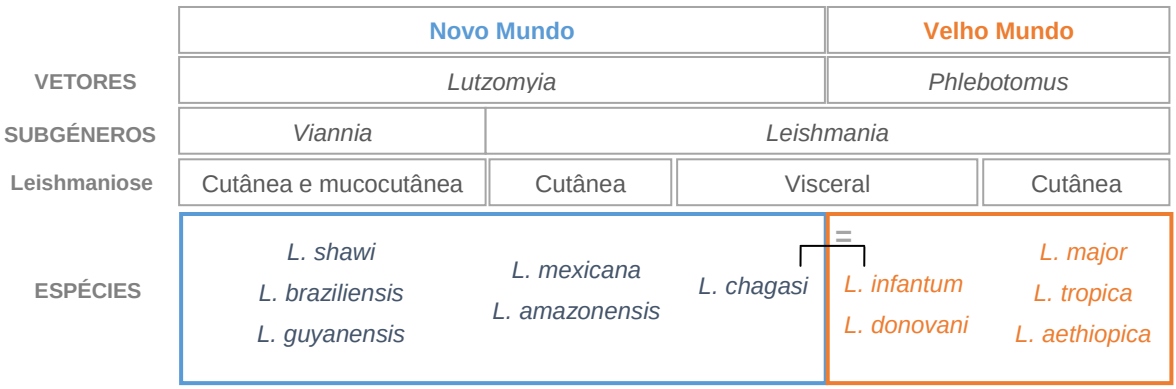

Figura 4 - Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral e respetivas espécies de *Leishmania* ssp..

1.4.1 Ciclo de Vida de *Leishmania* spp.

Formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* spp. são transmitidas através da picada de um flebótomo fêmea infetado, aquando da refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado. As formas infetantes são fagocitadas pelos macrófagos, onde se diferenciam em amastigotas que, por sua vez, iniciam um processo de replicação, acabando por provocar a rutura da membrana da célula hospedeira e subsequente libertação de parasitas que serão posteriormente fagocitados por novos macrófagos [21]. Os parasitas fagocitados podem permanecer no tecido subcutâneo, dando origem às

formas clínicas de leishmaniose cutânea, ou invadir as células do sistema mononuclear fagocítico, como o baço, fígado, medula óssea, gânglios linfáticos ou outros órgãos linfoides, causando assim a leishmaniose visceral [22].

Quando um flebótomo fêmea efetua uma nova refeição sanguínea no hospedeiro vertebrado infetado, este ingere macrófagos parasitados. No vetor, as formas amastigotas ingeridas são libertadas no intestino (médio, no caso do subgénero Leishmania, ou posterior, no subgénero Viannia) durante o processo digestivo. Os amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicos que se multiplicam por divisão binária, originando promastigotas metacíclicos. Estes migram para as válvulas faríngeas e destas para a probóscide, ficando disponíveis para ser depositados no hospedeiro aquando da refeição seguinte [21].

O ciclo de vida de *Leishmania* acima descrito encontra-se ilustrado na Figura 5.

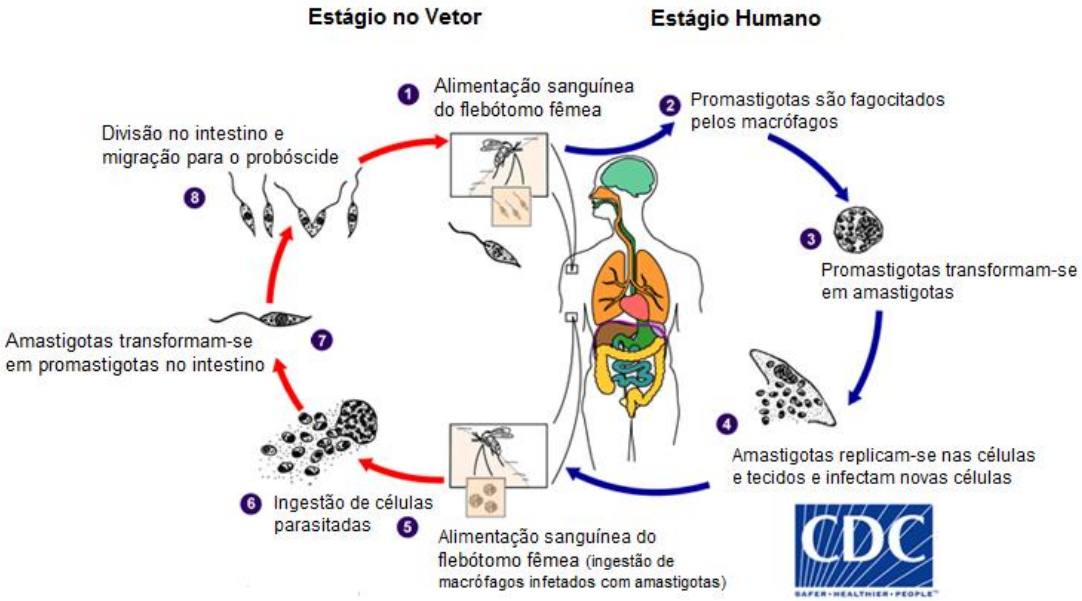

Figura 5 - Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Adaptado de [21]).

1.4.2 Epidemiologia e distribuição geográfica

A leishmaniose ameaça cerca de 350 milhões de pessoas em 98 países em todo o mundo e, segundo dados da OMS, 12 milhões de pessoas estão atualmente contaminadas, verificando-se cerca de 1 a 2 milhões de novos casos por ano [20].

A doença apresenta uma distribuição geográfica bastante ampla (Figura 6), que inclui as zonas intertropicais de África e da América e que se estende por regiões temperadas da América do Sul, Europa e Ásia [23].

A leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença, apresentando cerca de 1,5 milhões de novos casos por ano. É endémica em mais de 70 países e a grande maioria dos casos (90%) ocorre no Afeganistão, Argélia, Brasil, Iraque, Paquistão, Irão, Perú, Arábia Saudita e Síria [23–25].

A leishmaniose visceral é responsável, anualmente, por 500 000 novos casos anualmente em todo o mundo, com mais de 50 000 mortes associadas, manifestando-se em 65 países. Mais de 90% dos

casos ocorrem em áreas agrícolas entre os subúrbios pobres de seis países, nomeadamente Índia, Nepal, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Brasil [20,22,23].

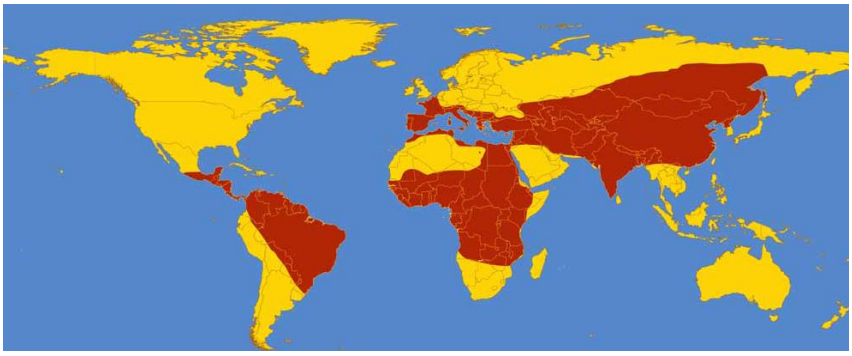

Figura 6 - Distribuição geográfica das zonas endémicas de leishmaniose [5].

1.4.3 Aspetos Clínicos da leishmaniose

O início da doença pode ser súbito ou gradual e o resultado clínico da infeção depende da variabilidade genética das diferentes espécies de parasita, do meio ambiente e da resposta imunitária do hospedeiro [19]. Para a maioria dos seres humanos infetados, a doença é assintomática, embora exista, ainda assim, uma minoria que desenvolve manifestações clínicas [20].

A LV representa a forma mais grave da doença, sendo essencialmente uma doença associada a crianças, embora também possa ocorrer em adultos. Os sintomas mais comuns incluem picos de febre irregulares, perda de peso, diminuição do apetite, sinais de anemia, distensão abdominal, com aumento do baço (esplenomegalia) e fígado (hepatomegalia), tosse, palidez e vómitos [20,23]. Por vezes, como complicação de LV ocorre leishmaniose dérmica pós-kala-azar (PKDL), que se caracteriza pelo aparecimento de pápulas, nódulos e erupção cutânea, que geralmente surgem no rosto, braços, tronco e outras partes do corpo [22,26].

LC é a forma mais comum da doença, desenvolvendo-se como uma única lesão que começa como um nódulo no local da picada e que depois evolui para uma úlcera. Após a cura, muitas vezes espontânea, permanecem cicatrizes no local das lesões [20,22].

A manifestação da LMC tende a ocorrer 1 a 5 anos após a LC e leva à destruição total ou parcial das membranas mucosas do nariz, boca e garganta e das cartilagens (pavilhão auricular, palato e septo nasal) [22,23].

1.4.4 Mecanismos de resposta imune frente à leishmaniose

Dois sistemas têm sido utilizados para estudar a infeção causada por *Leishmania* spp, com base na suscetibilidade e resistência do hospedeiro [27]. Nos animais suscetíveis à infeção, observa-se a disseminação dos parasitas para os gânglios linfáticos, baço e medula óssea, enquanto que nos animais resistentes, os parasitas mantêm-se localizados na pele (ou apenas atingem os gânglios linfáticos locais) [28].

O desenvolvimento da resposta imunitária protetora anti-*Leishmania* consiste na apresentação de antigénios apropriados por parte das células apresentadoras de antigénios e consequente expansão de células $CD4^+$, que apresentam um perfil de citocinas Th1 ou Th2 [29].

O tipo de resposta desenvolvida pelo hospedeiro infetado será crucial na evolução da doença. No caso do desenvolvimento de uma resposta de origem celular, os linfócitos T *helper* (Th1) estimulam a produção de IFN-γ, IL-2 e TNF-α, levando à ativação dos macrófagos capazes de eliminar o parasita, o que confere resistência à infeção, permanecendo assim o hospedeiro sem manifestações clínicas aparentes [30]. Por outro lado, se a resposta ativada for do tipo Th2, verifica-se uma maior produção das citocinas IL-4 e IL-10, que inibem a ativação dos macrófagos permitindo o aparecimento das formas clinicas [30].

Os animais que desenvolvem uma resposta predominantemente do tipo humoral, contam com uma elevada produção de anticorpos, desenvolvendo quadros clínicos severos de prognóstico reservado [31].

1.4.5 Diagnóstico da leishmaniose

O diagnóstico preciso da leishmaniose humana pode revelar-se complexo, uma vez que a doença abrange um espectro de sintomas e nem todos os pacientes desenvolvem manifestações clínicas. O diagnóstico deve basear-se numa abordagem integrada e ter em consideração o historial clínico do paciente e incluir métodos parasitológicos, métodos serológicos que avaliam a resposta imunitária especifica do hospedeiro e deteção molecular do DNA (ácido desoxirribonucleico) do parasita. Em particular, nos métodos parasitológicos é feita a observação microscópica ou a cultura de parasitas a partir de biópsias da medula óssea, de pele, de punção dos gânglios linfáticos ou raspados de lesões cutâneas [20].

Dentro dos métodos serológicos e a partir de abordagens moleculares, como o mapeamento de bibliotecas de expressão de genes de *Leishmania* spp. com soros de animais e de humanos infetados, diferentes moléculas antigénicas têm vindo a ser identificadas. Algumas das moléculas descritas são antigénios com origens diferentes, como por exemplo GP63 [32,33], LACK [34,35], GP46/M–2 [36], D13 ou p80 [37], [38], K9 e K26 [39], a proteína A2 específica de amastigotas [40], entre outras [41].

Cada uma destas moléculas antigénicas possui características particulares que a torna capaz de estimular a resposta imune do hospedeiro. A proteína GP63 é uma glicoproteína de 63kDa, conservada nas espécies de *Leishmania* e considerada o principal antigénio de superfície expresso em amastigotas de *Leishmania* spp [32,42]. A sua presença é também reconhecida em *T. cruzi* e *T. b. b*rucei [32,43].

Recentemente, testes de aglutinação direta (TAD) e imunocromatográficos (ICT) que utilizam o antigénio recombinante k39, foram desenvolvidos especificamente para diagnóstico de LV e apresentam elevada sensibilidade e especificidade [44,45],

1.4.5 Tratamento da leishmaniose

O número de medicamentos disponível para o tratamento da leishmaniose é limitado e as suas desvantagens incluem: alta toxicidade, desenvolvimento de resistência ao fármaco, eficácia limitada para diferentes estirpes e espécies e elevados custos [20,46]. Como primeira escolha no tratamento de LV e LC, são usualmente utilizados antimoniais pentavalentes - antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio. Apesar de terem sido desenvolvidos em 1945, estes continuam a ser regularmente utilizados, contudo, estes fármacos apresentam alguns efeitos secundários.

Nos últimos anos, verificou-se uma melhoria na terapêutica com o desenvolvimento de formulações lipídicas de anfotericina B, que têm sido avaliadas em ensaios clínicos de LV e/ou LMC [24]. Para além dos fármacos já mencionados, novos fármacos têm vindo a ser testados, como miltefosina, paromomicina, pentamidine e sitamaquine [46]. No caso da miltefosina, esta é já utilizada por alguns países como primeiro tratamento por via oral para leishmaniose visceral e cutânea [24].

Estudos clínicos recentes demonstraram o potencial benefício da combinação de fármacos para o tratamento da leishmaniose [46]. O reforço da eficácia e a diminuição da duração do tratamento são os principais benefícios da utilização de compostos que atuam em sinergia ou aditivamente. Para além disto, a combinação de terapêuticas surge também como solução para atrasar ou impedir o aparecimento de resistência, reduzir as doses administradas, diminuir da toxicidade e reduzir os custos do tratamento [24,47].

1.5 Tripanosomatídeos causadores de Doença de Chagas

Doença de Chagas ou tripanosomíase americana, descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, é a condição clínica desencadeada após infeção pelo parasita *Trypanosoma cruzi*. A infeção é transmitida aos seres humanos e a mais de 150 espécies de mamíferos selvagens e domésticos, por insetos triatomíneos (ordem *Hemiptera*, família Reduviidae e subfamília Triatominae) [48,49]. Estes representam 148 espécies, distribuídas por 18 géneros, dentro dos quais *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* apresentam relevância epidemiológica, uma vez que abrangem a maioria das espécies responsáveis pela transmissão da doença ao homem [50].

A transmissão da doença ocorre principalmente por meio de vetores em países endémicos [47]. Pode também ser transmitida por mecanismos não vetoriais, como transfusões de sangue de dadores infetados ou transmissões congénitas (sendo estas as principais causas de disseminação da doença nas zonas urbanas e países não endémicos), a partir de transplante de medula óssea ou de outros órgãos de dadores cronicamente infetados e, ainda, pela ingestão de alimentos ou líquidos contaminados com o parasita (como é o caso do açaí). Mais raramente, *T. cruzi* pode ser transmitido através de acidentes de laboratório a pessoas que trabalham com parasitas vivos [48].

1.5.1 Ciclo de Vida de *Trypanosoma cruzi*

Tirando algumas exceções, considera-se que o ciclo de *T. cruzi* ocorre entre invertebrados e vertebrados, apresentando quatro fases principais identificadas como: epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas e tripomastigotas sanguíneos.

As formas tripomastigotas metacíclicas do parasita são excretadas nas fezes do inseto, durante ou após a alimentação sanguínea. O prurido intenso no local da picada facilita a penetração das formas tripomastigotas metacíclicas através da ferida resultante da picada ou outras mucosas. Uma vez dentro do hospedeiro, os parasitas infetam as células circundantes ao local de entrada onde se diferenciam em amastigotas. Os amastigotas multiplicam-se por divisão binária e diferenciam-se em tripomastigotas que são libertados na corrente sanguínea, infetando novas células [51,52].

Alternativamente, quando as formas tripomastigotas sanguíneas são ingeridas pelo vetor transformam-se, no intestino médio, em epimastigotas. Os epimastigotas multiplicam-se e migram para o intestino posterior na forma de tripomastigotas metacíclicos que, por sua vez, são novamente eliminados nas fezes dos triatomíneos. Estas, se em contato com novo hospedeiro vertebrado, poderão reiniciar o ciclo infecioso [51].

O ciclo de vida de *T. cruzi* acima descrito encontra-se ilustrado na Figura 7.

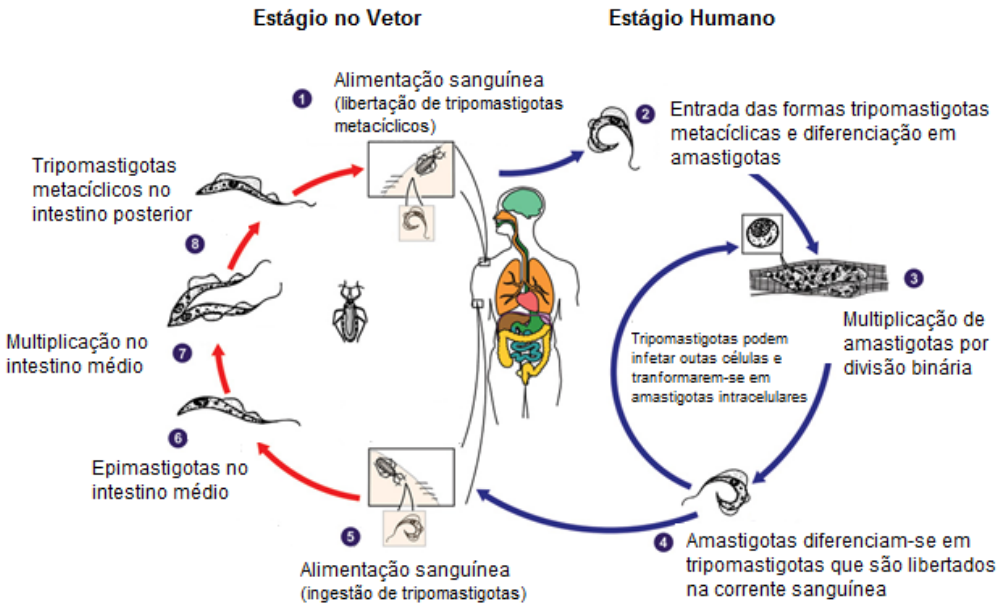

Figura 7 - Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (Adaptado de [52]).

1.5.2 Epidemiologia e distribuição geográfica

Tripanosomatídeos infetam, aproximadamente, 21 milhões de pessoas em todo o mundo, com uma gama de fenótipos variados [53]. Em particular, *T. cruzi* infeta 6 a 8 milhões de pessoas.

Relativamente à distribuição geográfica, a doença manifesta-se maioritariamente na América Latina, contudo, nas últimas décadas têm sido detetados cada vez mais casos nos Estados Unidos da América, Canadá, em alguns países europeus e do Pacífico Ocidental, devido essencialmente ao

intenso fluxo migratório entre a América Latina e o resto do mundo (Figura 8), assim como deficiência na triagem em bancos de doação de sangue [47].

Estimativas apontam atualmente para mais de 300 000 pessoas infetadas nos Estados Unidos da América, mais de 5 000 no Canadá, cerca de 80 000 na Europa e na região do Pacífico Ocidental, mais de 3 000 no Japão e por volta de 1 500 na Austrália [54,55].

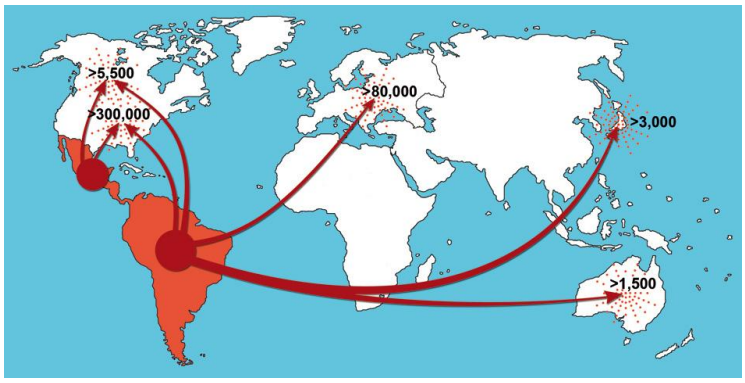

Figura 8 - Rotas de migração a partir da América Latina e estimativa do número total de indivíduos infetados em países não endémicos para a doença de Chagas [55].

Em zonas rurais da América Latina, as más condições de habitação favorecem a infestação do vetor, sendo que algumas habitações podem abrigar até 14 000 triatomíneos, onde estes se alimentam de sangue humano, permitindo a transmissão de *T. cruzi*. Focos de infestação doméstica podem ainda ser observados, especialmente, em áreas da Bolívia, onde foram relatadas as maiores taxas de prevalência da doença (6,8%), seguida da Argentina (4.1%), El Salvador (3.4%), Honduras (3.1%) e Paraguai (2.5%) [48,55] (Figura 9). No entanto, dois países com taxas de prevalência de 1% (Brasil e México) juntamente com a Argentina albergam quase 60% das pessoas infetadas com *T. cruzi* na América Latina [56].

A progressiva urbanização da população rural na América Latina, principalmente a partir da década de 1940, tornou a doença de Chagas um problema médico e social, tendo começado a ser mais significativa a transmissão de *T. cruzi* por transfusão de sangue. Em 1960, a OMS estimou 7 milhões de novos casos por ano devido à transfusão de sangue nesta região [55].

Figura 9 - Regiões endémicas da doença de Chagas.

1.5.3 Aspetos Clínicos da doença de Chagas

A doença de Chagas ocorre em duas fases. A fase inicial, aguda, dura cerca de 2 meses após a infeção. Durante esta fase um grande número de parasitas circulam no sangue mas, na maioria dos casos, os sintomas estão ausentes ou apresentam-se moderados e com a particularidade de não serem exclusivos da doença [47].

Os primeiros sinais visíveis podem ser uma ferida na pele, no local da picada do inseto, ou um edema das pálpebras do olho. Estes podem ser acompanhados de sintomas como febre, dor de cabeça, gânglios linfáticos aumentados, palidez, dor muscular, dificuldade em respirar, inchaço e dor abdominal ou torácica [47].

Na fase crónica, a doença afeta vários sistemas do organismo como o nervoso, digestivo e cardíaco. Cerca de 30% dos pacientes com sintomas crónicos sofrem de distúrbios cardíacos devido à presença de parasitas no coração. Estes destroem progressivamente o músculo cardíaco podendo causar insuficiência cardíaca e no limite morte súbita. Cerca de 10% dos pacientes apresenta danos no sistema digestivo que resultam em dilatação do trato digestivo (megaesófago e megacólon) e ainda alterações neurológicas [47].

1.5.4 Mecanismos de resposta imune frente à doença de Chagas

A resposta imunológica causada pela infeção por *T. cruzi* é complexa, verificando-se a ocorrência de diferentes tipos de resposta em regiões distintas do sistema imunitário, que incluem expansão celular, produção de citocinas e morte celular [57].

A fase aguda da doença representa o primeiro contato entre o parasita e o hospedeiro. Durante esta fase, estabelece-se uma resposta imunológica capaz de controlar os níveis de parasitemia observados nos estágios finais da fase aguda e durante toda a fase crónica [58,59]. Células de imunidade inata, tais como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células NK fornecem a primeira linha de defesa contra a infeção por *T. cruzi*, que precede o início da resposta imunitária específica de linfócitos T e B [58,60]. Adicionalmente, a síntese de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN-γ e TNF-α, desencadeia a ativação de macrófagos e o processo inflamatório, controlando a replicação do parasita [61,62]. Moléculas do parasita como ADN, RNA (ácido ribonucleico) e GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) desempenham também um papel importante no reconhecimento de *T. cruzi*, iniciando uma cascata de sinalização que controla positivamente a regulação de genes pró-inflamatórios essenciais para a resistência à infeção. Além disso, *T. cruzi* é responsável pelo aumento de IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α, IFN-β e IFN-γ e quimiocinas que recrutam células inflamatórias para o local da infeção [63].

A fase crónica da doença de Chagas caracteriza-se pela baixa parasitemia e altos níveis de anticorpos associados a uma resposta imunitária adquirida [56,59]. Para além disto esta fase tem sido associada à produção predominante de citocinas reguladoras, tais como IL-10, em relação às citocinas inflamatórias (IFN-γ e TNF-α). Pensa-se que a capacidade de produção de IL-10 num estádio mais tardio da fase aguda seja importante no controlo da resposta imunológica numa fase crónica. Contudo, é necessário alcançar um equilibro entre citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias

e um resposta celular eficaz de modo a manter os níveis de parasitas em conformidade, evitando danos nos tecidos [58].

1.5.5 Diagnóstico da doença de Chagas

O diagnóstico da fase aguda é baseado na deteção do parasita, uma vez que esta fase se caracteriza pela alta parasitemia. O método mais utilizado para observar formas tripomastigotas é um exame microscópico de um esfregaço de sangue fresco ou de uma camada leucocitária. As formas tripomastigotas nem sempre são fáceis de detetar, no entanto, a sua observação é mais fácil quando o sangue é colhido durante um pico de parasitemia.

Por outro lado, a fase crónica caracteriza-se pelo baixo nível de parasitemia (o que dificulta a identificação direta do parasita) e alto nível de anticorpos. Métodos como xenodiagnóstico, utilizado essencialmente em zonas endémicas e métodos serológicos como ELISA, hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta são utilizados durante esta fase [64]. Estes métodos baseiam-se essencialmente na deteção de anticorpos específicos contra antigénios de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Para facilitar o desenvolvimento deste tipo de métodos, vários antigénios têm sido testados, sendo que o principal objetivo é a identificação de antigénios com elevada sensibilidade e especificidade, baixa reatividade cruzada, elevada estabilidade e baixo custo [65].

Proteínas repetitivas constituem alvos bastante promissores uma vez que são altamente antigénicas, apresentando dois antigénios bem caracterizados: antigénio citoplasmático repetitivo (CRA) e antigénio flagelar repetitivo (FRA) [10,66]. CRA é uma proteína de 225 kDa composta por uma repetição de 14 aminoácidos, encontrada no citoplasma das formas epimastigotas e das formas amastigotas. FRA é uma proteína de 300 kDa composta por uma repetição de 68 aminoácidos, que se localiza no flagelo de todas as fases do ciclo de vida de *T. cruzi* [67]. Ambas as proteínas induzem a produção de várias classes de anticorpos em seres humanos, estando já a ser utilizadas numa variedade de estudos sobre o diagnóstico da doença de Chagas [68,69]. Em 1992 foram utilizados pela primeira vez, numa mistura das formas recombinantes, onde demostraram que a sensibilidade e especificidade da sua utilização em ensaios de *ELISA* era próxima de 100% [70].Outros estudos revelaram que o desempenho do diagnóstico foi melhorado quando as proteínas foram usadas em conjunto comparativamente com sua utilização individual [71,72].

A utilização de antigénios *TESA* (*trypomastigote excreted-secreted antigens*) em ensaios de *immunoblott* tem também sido proposta como um teste de diagnóstico alternativo sensível e específico. *TESA-blott* mostrou que uma banda de 150-160 kDa foi reconhecida no soro de 100% dos doentes com doença de Chagas crónica [73].

Outros antigénios de *T. cruzi* (TcG1, TcG2, e TcG4) foram identificados como candidatos ao desenvolvimento de vacinas e a um novo teste de diagnóstico uma vez que se mostraram capazes de induzir a imunidade protetora a *T. cruzi* em animais experimentais [74].

1.5.6 Tratamento da doença de Chagas

O tratamento da doença tem como principal objetivo a eliminação do parasita do organismo do individuo infetado e o controlo dos sinais e sintomas da infeção recorrendo à utilização de fármacos antiparasitários. Apenas dois medicamentos são recomendados para o tratamento da doença de Chagas. Benznidazol é o mais utilizado, apresenta um perfil mais seguro e a sua eficácia é notória durante a fase aguda da doença sendo por isso utilizado como tratamento de primeira linha [48,64]. Por outro lado, nifurtimox é pouco tolerado entre adultos, a sua implementação em zonas rurais pobres de países endémicos é difícil uma vez que os pacientes exigem uma monotorização de perto devido aos efeitos secundários associados à toma do medicamento [75].

Para ambos os fármacos verifica-se que a sua eficácia aumenta quando administrados logo após a infeção, no início da fase aguda, e que a sua capacidade de eliminação completa do parasita do organismo é limitada sobretudo em doentes cronicamente infetados [76]. Para além disto apresentam efeitos secundários como, dermatites alérgicas localizadas, náuseas, perdas de peso, insónia, entre outros sintomas [48].

Atualmente, a pesquisa centra-se essencialmente na produção de novos fármacos que proporcionem um tratamento mais curto e com menos efeitos secundários associados. Entre eles destacam-se os inibidores da biossíntese de ergosterol, como posaconazol e ravuconazol que tem mostrado resultados promissores no tratamento de doentes em fase aguda e crónica [20,77].

Apesar do progresso na identificação de novos fármacos, a proposta de tratamento mantêm-se a mesma há mais de 40 anos, não existindo tratamento eficaz para a fase crónica da doença.

1.6 Tripanosomatídeos causadores de Tripanossomose Africana

A Tripanossomose Africana (TA), também conhecida como doença do sono em humanos ou nagana em animais, é uma doença causada pelos parasitas da espécie *Trypanosoma brucei*, transmitidos pela picada de mosca do género *Glossina* (ordem *Diptera*, família *Glossinidae*), também conhecida por mosca tsé-tsé [78]. A doença foi identificada pela primeira vez em gado por David Bruce entre 1894 e 1899. Por sua vez, a identificação em humanos foi feita em 1903 por Aldo Castellani, que demonstrou a presença destes parasitas no sangue e no líquido encefálico raquidiano de um paciente infetado [79].

A Tripanossomose Humana Africana (THA) é a principal causa de morte e de incapacidade em 36 países da África subsariana [80]. Dentro das subespécies que integram a espécie *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *Trypanosoma brucei gambiense* são as responsáveis pela infeção em humanos. *T. b. rhodesiense*, circunscrito à região oriental da África subsariana, é responsável pelo desenvolvimento da fase aguda da doença, podendo causar a morte em poucas semanas ou meses. Em contrapartida, contribui com menos de 10% casos para o número total de casos de doença do sono [5]. A subespécie *T. b. gambiense* é encontrada predominantemente nas regiões central e ocidental da África subsariana e é responsável pelo desenvolvimento da fase crónica da doença e pela grande maioria dos casos de doença do sono (mais de 90%) [5,81].

Por outro lado, *T. b. brucei* é a subespécie responsável pela infeção de animais domésticos e selvagens. Após a infeção, os animais podem manifestar sintomas como anemias, emagrecimento, nascimentos prematuros, abortos, etc., constituindo nas zonas rurais afetadas, um grande obstáculo ao seu desenvolvimento económico [81,82].

1.6.1 Ciclo de Vida de *Trypanosoma brucei*

O ciclo de vida destes parasitas ocorre em parte, no sistema digestivo das moscas tsé-tsé infetadas e uma outra parte na corrente sanguínea dos mamíferos hospedeiros.

As formas tripomastigotas metacíclicas de *T. brucei* são transmitidas pela picada de uma mosca tsé-tsé infetada, durante a alimentação sanguínea. Após a entrada no hospedeiro, os parasitas, inicialmente localizados no tecido dérmico, são enviados pelo sistema linfático para a corrente sanguínea onde se transformam em tripomastigotas sanguíneos longos e esguios (designados por formas *slender*) [5,83].

De seguida, as formas *slender* dividem-se e multiplicam-se dispersando-se por outros fluidos corporais como linfa e líquido cefalorraquidiano acedendo ao sistema nervoso central do hospedeiro. Dependendo da carga parasitária, as formas *slender* evoluem para formas não proliferativas, mais curtas e largas denominadas por formas *stumpy* [83,84].

As formas sanguíneas *stumpy*, ingeridas pelo vetor durante a refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado infetado, transformam-se, no seu intestino médio, em tripomastigotas procíclicos. Estes parasitas migram para as glândulas salivárias, dando origem às formas epimastigotas que se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, capazes de infetar novamente o hospedeiro vertebrado durante a alimentação sanguínea, recomeçando o ciclo infecioso pelo parasita [5].

O ciclo de vida de *T. brucei* acima descrito encontra-se ilustrado na Figura 10.

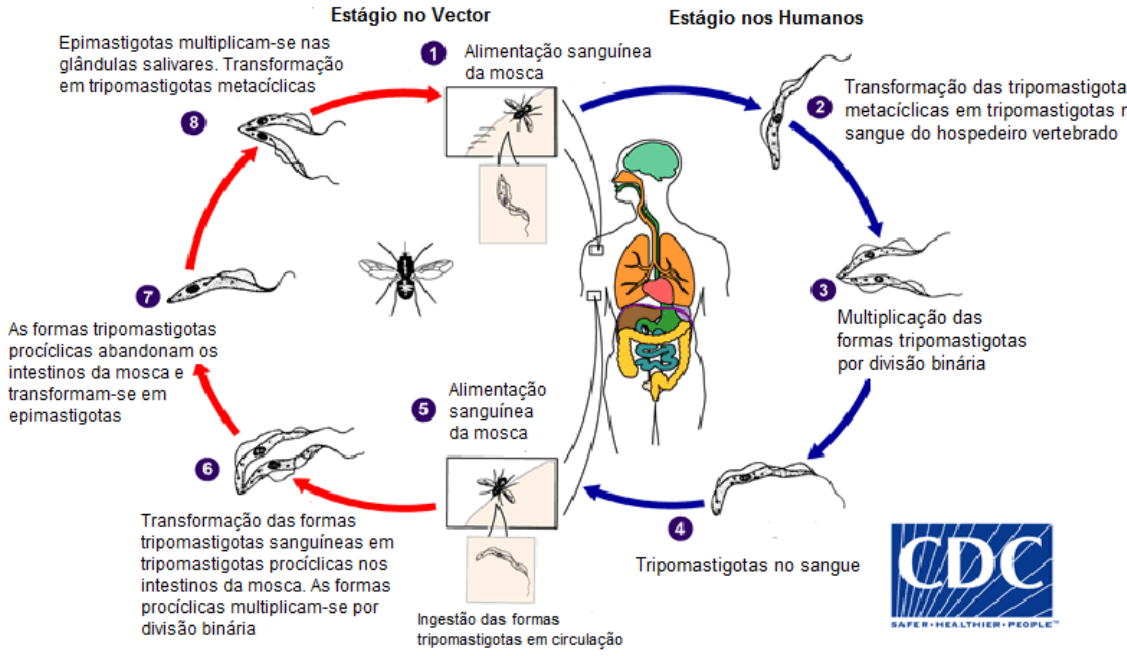

Figura 10 - Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei* (Adaptado de [85]).

1.6.2 Epidemiologia e distribuição geográfica

Desde a descoberta da TA vários foram os picos de epidemia registados no continente africano [5]. Entre 1949 e 1965 verificou-se uma diminuição significativa do número de novos casos registados, mas uma combinação de fatores – interrupção da vigilância da doença por interrupção dos sistemas de saúde pública, agitação socioeconómica, mudanças no clima e vegetação, aumento da resistência dos parasitas a fármacos, migração regional de bovinos infetados, etc. – contribuiu para o reaparecimento da doença nas últimas décadas [78,79].

Dados da OMS estimam que no ano 2000, 50 a 60 milhões de pessoas foram expostas à picada da mosca tsé-tsé no continente africano [20]. A área de infestação neste continente estende-se desde o limite sul do deserto do Saara (lat. 15° N) até Angola, Zimbabué e Moçambique (lat. 20° S) [82]. A THA é endémica em 36 países da África subsariana, 24 dos quais expostos à transmissão por *T. b. gambiense* e 13 expostos à transmissão por *T. b. rhodesiense*, sendo o Uganda o único país reportando os dois tipos [20].

Em 2006, foram detetados 17 036 novos casos de THA transmitida por *T. b. gambiense* no mundo inteiro, sendo que 59% dos casos ocorreram na República Democrática do Congo. Sudão e Angola relataram mais de 1 500 casos, enquanto que a República Africano Central, Chade, Congo, Tanzânia, Costa do Marfim, Guiné e Uganda relataram 50 a 1 500 casos cada. Por sua vez, Burkina Faso, Camarões, Guiné Equatorial, Gabão e Nigéria relataram menos de 50 casos cada [20].

Atualmente, o número de novos casos registados em todo o mundo tem vindo a diminuir. O ritmo de transmissão da doença parece abrandado significativamente, mas ainda existem algumas áreas onde é difícil avaliar a situação exata, pois a envolvente social instável ou o acesso remoto condicionam as atividades de vigilância e de diagnóstico. Países como Angola, Camarões, Congo, Costa do Marfim, Guiné Equatorial, Gabão, Gana, Guiné, Quénia, Malawi, Nigéria, Uganda, República Unida da Tanzânia, Zâmbia e Zimbabwe têm relatado menos de 100 novos casos por ano [81].

A Figura 11 apresenta a distribuição dos casos de THA no continente africano.

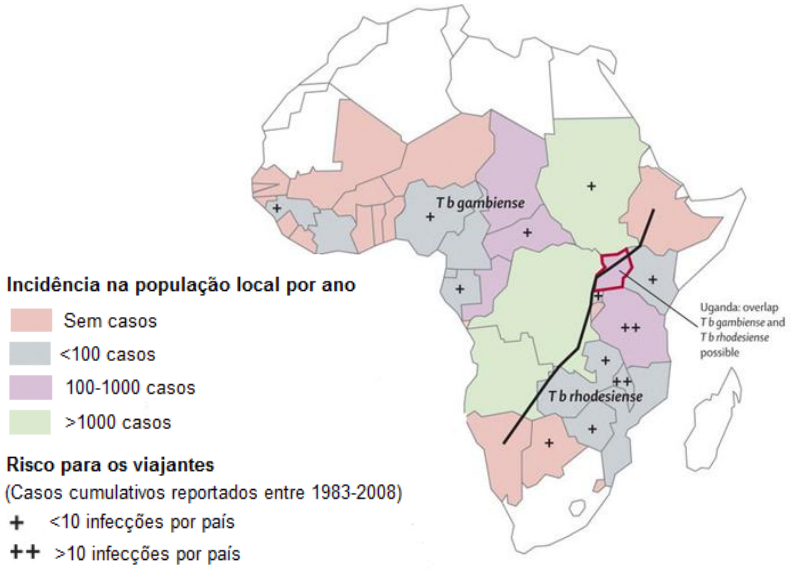

Figura 11 - Distribuição dos casos de THA em África (Adaptado de [86]).

1.6.3 Aspetos Clínicos da tripanossomose africana

Os primeiros sintomas da doença ocorrem geralmente 1-3 semanas após a picada da mosca tsé-tsé infetada com *T. brucei*. A proliferação dos parasitas no local da picada induz a formação de um nódulo inflamatório (5-15 dias após a picada) e podem ainda aparecer uma variedade de sintomas como febre, dor de cabeça, mal-estar e fraqueza [79,80].

À medida que a doença progride, verifica-se a falência de alguns órgãos ocorrendo episódios de taquicardia, insuficiência cardíaca e o aparecimento de lesões cutâneas em adição à formação do nódulo inflamatório no local da picada [79,80].

Numa segunda fase (ou fase neurológica), depois de algumas semanas, os parasitas invadem os órgãos internos do hospedeiro, principalmente, o sistema nervoso central. Esta fase caracteriza-se por frequentes episódios de dores de cabeça, perturbações do sono, perturbações psiquiátricas (incluem irritabilidade, ansiedade, alucinações, delírios, neurite ótica, etc.), reflexos anormais e perturbações do sistema nervoso [80].

Numa fase terminal da doença, o paciente desenvolve convulsões, incontinência, edema cerebral, deterioração mental progressiva e posteriormente pode ocorrer a morte do paciente, como consequência da própria doença ou devido a outras complicações [80].

1.6.4 Mecanismos de resposta imune frente à tripanossomose africana

Os seres humanos e outros primatas possuem uma resistência natural contra a subespécie *T. b. brucei* através de fatores tripanolíticos presentes no seu soro, contudo não são eficazes contra as formas *rhodesiense* e *gambiense* que causam a THA [87], [88]. Enquanto as formas sanguíneas são eliminadas durante a infeção, o sistema imunitário é continuamente atingido por grandes quantidades de antigénios invariáveis e VSG (*Variant Surface Glycoprotein*). O desenvolvimento de uma resposta imune adequada torna-se difícil uma vez que as proteínas invariáveis se encontram inacessíveis dentro dos parasitas vivos e as VSG, proteínas acessíveis, mudam periodicamente [89].

Numa primeira fase, o ADN libertado pelos parasitas eliminados é o responsável pela ativação dos macrófagos, causando a secreção de várias moléculas pró-inflamatórias (Tipo I) como o TNF--α, IL-1 e IL-6 e óxido nítrico (NO) [90,91]. Os macrófagos ativados são capazes de eliminar parasitas opsonizados pelos anticorpos e libertar substâncias tóxicas, como NO e TNF-α, para o controlo do primeiro pico de parasitemia [92–94].

A resposta inflamatória inicial é benéfica para o hospedeiro numa fase inicial da infeção, contudo a continuação da inflamação pode ser prejudicial ao organismo. Deste modo, é essencial reduzir a resposta inflamatória, pela inibição dos macrófagos e libertação de citocinas anti-inflamatórias (Tipo II) como IL-4, IL-10 e IL-13, que estão associadas a uma maior sobrevivência do hospedeiro [91]. Assim, uma resposta do tipo I é desenvolvida durante a fase inicial da infeção controlando o parasita e uma mudança para a resposta do tipo II, na fase tardia da infeção, surge na tentativa do organismo controlar a patologia [90].

No que diz respeito à formação de uma resposta humoral, a tripanossomose caracteriza-se por uma ativação policlonal de células B, que resulta numa grande produção de imunoglobulinas da classe IgM, a primeira classe de anticorpos gerados pelo contacto com novos antigénios [89,95].

Com a progressão da infeção, as células B são suprimidas resultando na ausência de resposta de IgG e no decréscimo da produção de IgM [96]. Uma das características deste tipo de infeção, é a supressão generalizada das funções humorais e celulares do sistema imune, permitindo o desenvolvimento de infeções oportunistas [89,97]. A imunossupressão é marcada por uma inibição da proliferação das células T, devido à regulação negativa tanto da produção da IL-2 como da expressão do seu recetor [98,99].

1.6.5 Diagnóstico da tripanossomose africana

O quadro clínico da TA é subjetivo uma vez que os sintomas são comuns a outras doenças, como a malária, bacterianas e VIH [100].O diagnóstico de qualquer paciente deve ser feito com base numa combinação do contexto epidemiológico local, onde a doença é conhecida como endémica e a sua condição clínica [80].

A confirmação do diagnóstico é feita através de métodos laboratoriais e baseia-se na deteção do parasita por observação microscópica de sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR) ou de aspirados dos gânglios linfáticos [78,100] (Figura 12).

Figura 12 – *Trypanosoma brucei* em sangue humano observado por microscopia eletrónica de varrimento [100] (Créditos de imagem: Science Photo Library).

Embora a deteção de parasitas no sangue seja bem sucedida em casos de infeção com *T. b. rhodesiense*, devido a níveis de parasitemia permanente, o mesmo não acontece em casos de infeção com *T. b. gambiense* [100]. Os testes serológicos apresentam-se assim como uma alternativa de diagnóstico neste tipo de infeção, nomeadamente o CATT/*T. b. gambiense* (*Card Agglutination Test for Trypanosomiasis*).

CATT/*T. b. gambiense* é um teste de aglutinação usado para a deteção de anticorpos no sangue, plasma ou soro de indivíduos potencialmente infetados e apresenta-se como uma metodologia sensível, rápida e de custos reduzidos [100]. Outro tipo de métodos serológicos podem ser utilizados, como os ensaios de imunofluorescência e ELISA contudo, são vários os inconvenientes associados a testes de deteção de anticorpos uma vez que os antigénios utilizados estão mal definidos e

caracterizados, tornando difícil a normalização dos testes, no que diz respeito à sensibilidade e especificidade [101].

De modo a ultrapassar esta dificuldade, possíveis alvos presentes em *T. brucei*, têm vindo a ser estudados e sugeridos como fortes candidatos antigénicos [102].

Tendo em conta a capacidade de variabilidade antigénica apresentada em *T. brucei*, vários investigadores desenvolveram trabalhos no sentido de encontrar proteínas invariáveis destes parasitas. Foram já identificados componentes proteicos invariáveis *em T. brucei*, denominados ISG64, ISG65 e ISG75 (*Invariant Surface Glycoproteins*) de 64, 65 e 75 kDa respetivamente [103,104]. O gene associado à lise mediada pelo soro humano (SRA) apresenta-se também como candidato antigénico. O seu potencial deve-se à capacidade de *T. b. rhodesiense* em resistir a um fator tripanolítico apresentado no soro humano, contrariamente ao *T. b. brucei*, que sofre lise quando incubado com o soro humano [105]. A identificação e caracterização do gene SRA em *T. b. rhodesiense* aparece como uma oportunidade de identificar e distinguir estas duas populações de *T. brucei*, uma vez que a expressão do gene SRA é suficiente para caracterizar a estirpe de *T. brucei* resistente à ação tripanolítica do soro humano, sendo assim utilizado como um marcador molecular em *T. b. rhodesiense* [106].

1.6.6 Tratamento da tripanossomose africana

A determinação do estádio da doença é importante para se proceder ao seu tratamento. A OMS recomenda o exame ao LCR, obtido através de uma punção lombar, para a deteção de tripanossomas, contagem dos leucócitos e concentração total de proteínas. Níveis de leucócitos superiores a 5células/µL ou concentrações de proteínas superiores a 370 mg/L caracterizam a fase neurológica de THA [20].

A terapêutica utilizada, baseia-se essencialmente em quatro fármacos, que são aplicados de acordo com o estádio em que a doença se encontra. Numa fase inicial da doença são administrados suramina e pentamidina (exclusivamente em pacientes infetados com *T. b. gambiense*), considerados mais seguros e fáceis de administrar [100]. Numa segunda fase de infeção são utilizados fármacos que atravessam a barreira hemato-encefálica de modo a alcançar o parasita: melarsoprol e eflornitina. Recentemente, a combinação de nifurtimox e eflornitina está também a ser utilizada como terapêutica para o segundo estádio da doença [81].

Todos estes fármacos são potencialmente perigosos e apresentam diversos efeitos secundários. Entre eles, destaca-se o melarsoprol que provoca uma encefalopatia reativa em aproximadamente 10% dos pacientes tratados, sendo em média fatal para 50% destes casos [100].

Capítulo 2 - Objetivos

O objetivo principal do presente trabalho passa pela caracterização de antigénios com reatividade serológica cruzada em tripanosomatídeos (*Leishmania* spp.*, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi*).

Para atingir o objetivo principal, serão utilizadas amostras de soros de murganhos imunizados, (experimentalmente) infetados e de humanos e canídeos (naturalmente) infetados com um dos três tipos de tripanosomatídeos. Em particular, pretende-se:

(1) Produzir e caracterizar soros policlonais anti-*Leishmania* spp., anti-*T. cruzi* e anti-*T. b. brucei* em murganhos;

(2) Determinar a reatividade serológica cruzada dos diferentes soros policlonais monoespecíficos produzidos contra cada uma das espécies;

(3) Caracterizar soros de infeção natural por *Leishmania* spp., *T. cruzi* e de infeção experimental por *T. b. brucei*;

(4) Caracterizar e identificar por *immunoblotting* os antigénios envolvidos na reatividade serológica específica (anti-*Leishmania* spp., anti-*T. cruzi* Y e anti-*T. brucei brucei*) e na reatividade serológica cruzada entre os três tripanosomatídeos;

(5) Realizar uma análise *in silico* dos antigénios envolvidos na reatividade serológica no contexto da leishmaniose, doença de Chagas e tripanossomose africana.

Os resultados obtidos com este estudo poderão contribuir na identificação de marcadores serológicos durante uma infeção com um dos três tripanosomatídeos e potencializar a utilização de tais marcadores como candidatos antigénicos para o desenvolvimento de vacinas.

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1 Animais

Todos os animais utilizados neste estudo foram obtidos e mantidos no Biotério do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Lisboa – Portugal. Murganhos (*Mus musculus* L.) da linhagem Balb/C, fêmeas entre 5 a 8 semanas de idade, foram mantidos em gaiolas apropriadas de acordo com as normas técnicas de proteção animal publicadas na portaria nº 1005/92 de 23 de Outubro de 1992 dos Ministérios da Agricultura, Educação, Saúde e do Comércio e Turismo Os procedimentos animais utilizados neste estudo foram creditados pela Direção Geral de Veterinária do Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Lisboa – Portugal.

3.2 Parasitas

No presente estudo foram utilizadas estirpes de *Leishmania* spp., de *Trypanosoma cruzi* Y e *Trypanosoma brucei brucei.*

Leishmania amazonensis - MHOM/BR/1973/M2269[1]

O parasita foi isolado em 1973 de um paciente com leishmaniose cutânea anérgica difusa, no Estado do Pará, no Norte do Brasil. Esta estirpe foi identificada no Instituto Evandro Chagas, em Belém, no Estado do Pará, Brasil com recurso a anticorpos monoclonais e através da análise do perfil enzimático. Formas amastigotas foram mantidas em murganhos BALB/c através da inoculação do parasita nas patas traseiras e promastigotas foram isolados em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) - 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) [107,108].

Leishmania guyanensis - MHOM/BR/2001/M19663[2]

O parasita foi isolado, em 2001, de um paciente com leishmaniose cutânea da microrregião de Santarém, na mesoregião do Baixo Amazonas, no Estado de Pará, Brasil. Tecido triturado da lesão, obtido por biópsia, foi inoculado nas patas traseiras de hamsters e isolado em meio Difco B45. No Instituto Evandro Chagas, em Belém, Brasil procedeu-se à sua identificação através da determinação do perfil enzimático e pelo uso de anticorpos monoclonais [109].

Leishmania infantum - MCAN/2012/IHMT0003SG[3]

O parasita foi obtido por citologia aspirativa com agulha fina do gânglio linfático de um canídeo do canil municipal da região metropolitana de Lisboa, Portugal e mantido, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) por passagens sucessivas em murganhos BALB/c. Formas promastigotas foram isoladas em meio Schneider's Drosophila (Sigma-Aldrich, Alemanha) suplementado com 10% de FBS [110].

[1] Gentilmente cedido pelo Professor Doutor Luiz Felipe Passero – USP, Brasil
[2] Gentilmente cedido pelo Professor Doutor Luiz Felipe Passero – USP, Brasil
[3] Gentilmente cedido pela Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes, IHMT, Portugal

Leishmania shawi - MHOM/BR/96/M15789[4]

O parasita foi isolado em 1973 de um paciente com leishmaniose tegumentária Americana, em Buriticupu, no Estado do Maranhão, no Norte do Brasil. A estirpe foi identificada no Instituto Evandro Chagas, em Belém, no Estado do Pará, Brasil com recurso a anticorpos monoclonais e pela análise do perfil enzimático, Formas amastigotas foram mantidas em murganhos BALB/c através da inoculação dos parasitas nas patas traseiras e promastigotas foram isolados em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS a partir dos murganhos infetados [111].

Trypanosoma cruzi Y[5]

Estirpe isolada de um caso agudo de Doença de Chagas por Silva e Nussenzweig, em 1953. Formas tripomastigotas foram mantidas em murganhos *Swiss* e formas epimastigotas em meio de cultura LIT (Liver Infusion Tryptose), desenvolvido por Camargo (1964) [112] e modificado por Martinez (2004) [113,114].

Trypanosoma brucei brucei – GVR 35

Estirpe isolada de animais selvagens em 1966 do Parque Nacional de Serengeti, Tanzânia [115].

3.3 Cultura axénica de *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* Y

Para obtenção dos extratos parasitários das estirpes *Leishmania* e *T. cruzi* foi necessária a sua cultura prévia em condições axénicas.

3.3.1 Cultura de *Leishmania*

As formas promastigotas virulentas das quatro espécies de *Leishmania* em estudo encontram-se criopreservadas em azoto líquido, nas instalações do IHMT.

Após descongelação das amostras criopreservadas, foi feita uma centrifugação a 1800xg durante 10min de forma a separar os parasitas do meio de congelação considerado tóxico devido à presença de dimetilsulfóxido 10% (DMSO, *Dimethyl sulfoxide*). O sobrenadante foi descartado e os parasitas ressuspendidos em 1mL de meio Schneider. Posteriormente, os parasitas foram transferidos para frascos de cultura (*T-flask)*, aos quais se adicionaram previamente 1mL de meio Schneider tendo sido mantidos a 24ºC.

Para a obtenção de *L. infantum* virulenta respeitou-se o limite de cinco passagens sugerido na literatura [110].

O volume das culturas foi duplicado, sempre que, após observação no microscópio invertido, se verificava elevada densidade de parasitas.

[4] Gentilmente cedido pelo Professor Doutor Luiz Felipe Passero – USP, Brasil
[5] Gentilmente cedido pela Professora Doutora Aline Rimoldi Ribeiro – UNICAMP, Brasil.

3.3.2 Cultura de *Trypanosoma cruzi* Y

A cultura das formas epimastigotas de *T. cruzi* Y iniciou-se com a transferência de 1mL de uma cultura pré-estabelecida para um *T-flask* ao qual se adicionou previamente 5mL de meio LIT. A cultura foi mantida a 24°C e o seu volume foi sendo duplicado, sempre que, após observação no microscópio invertido se verificava elevada densidade de parasitas, até ao volume máximo suportado pelo *T-flask*.

3.4 Infeção de Murganhos com *Trypanosoma brucei brucei* para produção de extrato proteico total

Murganhos das linhagens Balb/C foram infetados com parasitas *T. b. brucei* crio-preservados. A inoculação dos parasitas foi realizada com uma dose mínima infetante capaz de desenvolver os sinais e sintomas clínicos da infeção, por via intraperitoneal segundo protocolo já estabelecido [116]. Uma semana após a infeção, amostras de sangue foram colhidas para avaliação da presença de parasitas no sangue por microscopia ótica. Quando se atingiu o pico de parasitemia, os animais foram sacrificados por punção cardíaca para recolha do sangue total.

3.5 Obtenção do extrato proteico total dos diferentes tripanosomatídeos

3.5.1 *Leishmania e Trypanosoma cruzi* Y

Após atingirem a capacidade volumétrica máxima dos *T-flasks* e se confirmar que se encontravam na fase estacionária de crescimento, as culturas de *Leishmania* spp. e *T. cruzi* Y foram centrifugadas 3000g a 4ºC, durante 10 min e os sobrenadantes conservados a -20ºC, para posterior utilização. Os sedimentos (*pellets*) foram submetidos a 3 lavagens em PBS (*Phosphate Buffer Saline*), por centrifugação, a 4ºC, a 3000g durante 10 min. De seguida, os parasitas foram ressuspendidos num tampão de lise contendo inibidor de proteases. Os extratos foram preservados a -20ºC até posterior utilização.

3.5.2 *Trypanosoma brucei brucei*

O sangue colhido dos murganhos infetados com *T. b. brucei* foi submetido a uma cromatografia de troca aniónica em coluna de DEAE-Sepharose® *Fast Flow* (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) previamente lavada com água Milli-Q e equilibrada com PBS-Glicose 20 mM pH 7,4 [117]. As frações obtidas pela eluição da coluna foram recolhidas em tubos de micro centrífuga de 1mL, que já continham 200µL de PBS-Glicose 20 mM pH 7,4, e monitorizadas em lâminas de vidro por microscopia ótica convencional quanto à presença das formas sanguíneas de *T. b. brucei*.

Para obtenção do extrato proteico, as frações contendo os parasitas foram lavadas por centrifugação a 10000 g durante 10min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 500 µL de PBS com inibidor de proteases. Os extratos foram preservados a -20ºC até posterior utilização.

3.6 Determinação da concentração proteica dos extratos dos diferentes tripanosomatídeos

Os extratos de *Leishmania* spp. e *T. cruzi* Y, obtidos a partir do protocolo descrito anteriormente, foram quantificados pelo método de Bradford (Bio-Rad, EUA) numa placa de microtitulação (*BRANDplates® - pureGrade™, BRAND*, Alemanha).

Com o objetivo de estabelecer uma curva padrão, foram realizadas diluições sucessivas da solução stock de 10 mg/mL (Sigma, EUA) de BSA em PBS obtendo padrões como uma concentração de 125 a 2000 µg/mL (intervalo de linearidade entre 125 e 1000 µg/mL). Aos poços correspondentes à curva padrão foram adicionados 250 µL do reagente de Bradford (*Quick Start™ Bradford 1× Dye Reagent, Bio-Rad*, EUA) e 5 µL de cada padrão. O padrão de concentração de 0 mg/mL contem apenas a solução de PBS e corresponde ao branco.

Para cada amostra, foram testadas duas diluições (1:5 e 1:10) em duplicado, sendo adicionados a cada poço 5 µL da amostra diluída a 250 µL do reagente de Bradford.

Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, foi efetuada a leitura das absorvâncias a um comprimento de onda de 562nm. A concentração de cada extrato parasitário foi determinada recorrendo à reta de regressão linear construída a partir das densidades óticas (DO) e concentrações dos padrões.

Para quantificação dos extratos de *T. b. brucei*, recorreu-se ao método *Bicinchoninic Acid Protein* (Sigma, EUA). Este procedimento é praticamente idêntico ao descrito anteriormente para o método de Bradford. Neste caso para estabelecer uma curva padrão, adicionaram-se as quantidades necessárias de reagente de trabalho e foram realizadas diluições sucessivas da solução stock de 1 mg/mL (Sigma, EUA) de BSA em PBS obtendo padrões como uma concentração de 150 a 1000 µg/mL (intervalo de linearidade entre 200 e 1000 µg/mL. Aos poços correspondentes à curva padrão foram adicionados 225 µL de cada padrão preparado anteriormente.

Para cada amostra, foram testadas duas diluições (1:5 e 1:10) em duplicado, sendo adicionados a cada poço 25 µL da amostra diluída a 200 µL do reagente de trabalho.

Após 30min de incubação a 37ºC, foi efetuada a leitura das absorvâncias a um comprimento de onda de 562nm. Uma vez mais, a concentração de cada extrato parasitário foi determinada recorrendo à reta de regressão linear construída a partir das DO e concentrações dos padrões.

De notar, que o reagente de trabalho utilizado se encontrava diluído na proporção 50A:1B e os reagentes A e B fornecidos pelo fabricante.

3.7 Produção de anticorpos policlonais monoespecíficos através de imunização de murganhos da linhagem Balb/C

De modo a avaliar a reatividade cruzada entre tripanosomatídeos, com recurso a técnicas imunoquímicas foi necessária a produção de anticorpos policlonais anti-*L. amazonensis*, anti-*L. guyanensis*, anti-*L. infantum*, anti-*L. shawi*, anti-*T. cruzi* Y e anti-*T. b. brucei*.

Para tal, grupos de 3 murganhos da linhagem Balb/C foram imunizados pela via subcutânea com a injeção de mistura de extrato proteico dos respetivos parasitas e adjuvante, de modo a induzir a

resposta imune efetiva. Inoculou-se, na primeira imunização, uma emulsão composta por 100 µg de extrato proteico parasitário e Adjuvante completo de Freund (ACF) (Sigma, EUA). Posteriormente, quatro e seis semanas após a primeira inoculação realizaram-se a segunda e terceira imunização, respetivamente, com 100 µg do extrato proteico e Adjuvante incompleto de Freund (AIF) (Sigma, EUA).

Ao longo das imunizações, amostras de soros dos animais imunizados foram analisadas por ELISA de modo a avaliar o título de anticorpos. Em função do valor do título, realizaram-se as imunizações seguintes ou o sacrifício do animal.

Após a colheita, as amostras de sangue foram incubadas a 37°C por 30 minutos e posteriormente a 4°C durante 1h. Para obtenção do soro, as amostras de sangue foram centrifugadas a 10000 g durante 10min e o soro (sobrenadante) retirado e armazenado a -20ºC até ao momento de utilização. Quando necessário, o soro foi descongelado à temperatura ambiente e um pool de diferentes grupos de soro foi utilizado para a determinação de anticorpos anti-*Leishmania* spp., anti-*T. cruzi* Y e anti-*T. b. brucei*.

3.8 Caracterização dos anticorpos policlonais monoespecíficos anti-tripanosomatideos

Placas de microtitulação de 96 poços (Nunc™, Roskilde – Dinamarca) foram utilizadas para adsorção dos extratos proteicos dos parasitas (100 ngproteína/poço), diluídos em tampão bicarbonato 0,1 M pH 8,5, que permaneceram em incubação a 4ºC durante a noite. No dia seguinte, o excesso de proteína foi removido com a lavagem dos poços por 3 vezes, com tampão de lavagem (200µL/poço de PBS-Tween 20 (Promega, EUA) 0,05% (v/v)). Posteriormente, a placa foi bloqueada com a adição de 200 µL/poço de uma suspensão de PBS-leite (Molico®, Nestlé – Portugal) 5% (m/v). Após incubação da placa durante 1h, com a solução de bloqueio, à temperatura ambiente, sob agitação e ao abrigo da luz, os poços foram novamente lavados com tampão de lavagem e de seguida adicionou-se 100µL/poço de diferentes soluções de amostras de soro dos murganhos, diluídos de forma seriada partindo de uma diluição inicial de 25x até um máximo de 3200x, em PBS-leite 0,1% (m/v) Tween 0,05% (v/v). Após nova incubação durante 1h em condições iguais às descritas anteriormente, procedeu-se a uma nova etapa de lavagem com tampão de lavagem e posteriormente adicionou-se 100µL/poço de anticorpos conjugados anti-IgG de murganhos acoplados com peroxidase (Sigma, EUA) diluído na proporção de 1/4000 em PBS-leite 0,1% (m/v) Tween 0,05% (v/v). Seguiu-se uma etapa de incubação durante 1h, uma última lavagem dos poços com tampão de lavagem e a adição de 100 µL/poço da solução substrato [10 mL de tampão citrato pH 5,0 contendo 10 mg de *o-phenylenediamine dihydrochloride* (OPD) (Sigma, EUA) e 10 µL de peróxido de oxigénio 30% (Sigma, Alemanha)]. Após incubação de 30min, adicionou-se 50 µL/poço de uma solução de ácido sulfúrico 4N para parar a reação. Por último, determinou-se a absorvância da reação num leitor de placa de ELISA (680 Microplate Reader Bio-Rad, EUA) com um comprimento de onda de 490 nm.

3.9 Caracterização antigénica da reatividade serológica específica e cruzada entre os diferentes tripanosomatídeos

Para caracterização e identificação dos antigénios responsáveis pela reatividade serológica específica e cruzada nas diferentes populações, recorreu-se à técnica de *Western Blot*.

As proteínas presentes nos extratos proteicos totais dos diferentes tripanosomatídeos foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Começou por se preparar o gel de corrida de modo a resolver o perfil eletroforético, com uma solução com uma concentração de 10% e de seguida preparou-se o gel de empilhamento. A composição de cada um dos géis encontra-se sumarizada na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição do gel de poliacrilamida a 10%.

Reagentes	Gel de Corrida 10% Acrilamida (µL)	Gel de Empilhamento (µL)
H2O Destilada	4100	2500
Solução de Acrilamida (30% Acrilamida + 0,8% Bis-Acrilamida)	3300	450
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	2500	-
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	-	333
SDS 10%	100	100
Persulfato de Amónia 30%	50	25
TEMED	5	2,5

Os extratos previamente diluídos a uma concentração de 1 mg/mL foram diluídos 1:1 em tampão de amostra para SDS-PAGE para obtenção de uma concentração final de 500 µg/mL. Após diluição, as amostras foram fervidas à temperatura de +100ºC durante cinco minutos.

Nos géis já polimerizados, foram aplicados 200 µL de extrato em poço único, equivalentes a 5 µg. Num outro poço foram aplicados 7 µL de um marcador de massa molecular (*HyperPAGE Prestained Protein Marker, Bioline,* Reino Unido). Após aplicação das amostras, os géis foram submersos num tampão de corrida condutor de corrente e submetidos inicialmente a uma corrente elétrica constante de 80V. Depois das amostras entrarem no gel de corrida aumentou-se a voltagem para 120V, durante aproximadamente 1,5 h, até a frente de corrida se aproximar do seu limite inferior.

De seguida, o conteúdo proteico do gel de poliacrilamida foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, Reino Unido) sobre a qual se executaram as reações de *Western Blotting*. A membrana foi cortada em tiras e cada tira colocada, separadamente, numa placa. Cada tira da membrana foi, inicialmente, lavada duas vezes com uma solução de lavagem [Tween-20 0,05% (v/v) em PBS] e uma vez com PBS (10 minutos de incubação para cada uma das lavagens). Finalizadas as lavagens, cada tira da membrana foi bloqueada com solução de bloqueio [3% leite em pó (m/v) em PBS] durante 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. De seguida, o esquema de lavagem foi repetido e as tiras da membrana incubadas com o anticorpo primário numa diluição 1:100 (v/v) em tampão anticorpo (1% tampão de bloqueio em tampão de lavagem), durante 1h, à

temperatura ambiente, sob agitação. Esquema de lavagem foi repetido e cada tira da membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anticorpos conjugados anti-IgG de murganhos acoplados com peroxidase) (Sigma, EUA) diluído 1:5000 (v/v) em tampão anticorpo durante 1hora à temperatura ambiente, sob agitação. No final da incubação, as tiras da membrana foram lavadas cinco vezes com solução de lavagem (10minutos de incubação para cada uma das lavagens) e incubadas com solução de desenvolvimento [solução DAB (3,3' – Diaminobenzidine tablets, Sigma-Aldrich, EUA)] em PBS], à temperatura ambiente, até ao desenvolvimento de cor. A reação foi terminada com água desionizada e cada tira da membrana deixada ao ar a secar.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

Dada a importância dos testes serológicos no diagnóstico das três principais tripanossomíases humanas e animais, designadamente Leishmaniose, doença de Chagas e Tripanossomíase Africana, e uma vez que os testes de diagnóstico disponíveis atualmente apresentam a problemática da reatividade cruzada, o presente estudo tem como principal objetivo o conhecimento e identificação dos antigénios responsáveis pela reatividade serológica em infeções causadas por *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei brucei*. Para alcançar tal objetivo, a base deste estudo consistiu na avaliação da reatividade imunológica específica e cruzada das/entre as diferentes populações de tripanosomatídeos: *Leishmania* spp., *T.cruzi* e *T. b. brucei*.

Numa primeira fase, foi necessária a produção dos extratos proteicos totais de cada um dos parasitas mencionados acima. De seguida, os referidos extratos foram utilizados para a imunização de murganhos com o objetivo de produzir soros policlonais monoespecíficos contra cada um dos extratos proteicos da forma promastigota de *Leishmania* spp., da forma epimastigota de *T. cruzi* e da forma tripomastigota sanguínea de *T. b. brucei*. A reatividade serológica dos soros policlonais monoespecíficos foi determinada a partir de ensaios de ELISA que permitiram determinar os níveis de anticorpos com reatividade serológica para cada um dos extratos e/ou entre os extratos dos restantes parasitas e determinar o nível de reatividade serológica entre os três tripanosomatídeos.

Posteriormente, após a determinação das reatividades serológicas de cada um dos soros policlonais (anti-*Leishmania* spp., anti-*T.cruzi* e anti-*T. b. brucei*) frente a cada um dos extratos proteicos, procurou-se identificar os antigénios presentes em cada um dos extratos proteicos e responsáveis por tais reatividades serológicas. Por *immunoblotting*, pretendeu-se caracterizar imunoquimicamente, os soros policlonais monoespecíficos e soros de infeção causada por *Leishmania* spp., *T.cruzi* e *T. b. brucei*.

4.1 Determinação dos títulos de anticorpos dos diferentes soros policlonais monoespecíficos

Para caracterização dos títulos dos anticorpos policlonais monoespecíficos anti-*Leishmania* spp., anti-*T. cruzi* e anti-*T. b. brucei* foi inicialmente necessária a produção de extrato proteico total de *L. amazonensis, L. guyanensis*, *L. infantum*, *L. shawi*, *T. cruzi* Y e *T. b. brucei* utilizados posteriormente como fonte de antigénios. No caso de *Leishmania* spp. e *T. cruzi* Y, os extratos parasitários foram obtidos por cultura axénica das formas promastigotas e epimastigotas, respetivamente. Para obtenção de extrato proteico das formas tripomastigotas sanguíneas de *T. b. brucei*, murganhos Balb/C foram inoculados com a dose mínima infetante, 500 parasitas/animal, capaz de desenvolver os sinais e sintomas clínicos da infeção. Os níveis de parasitemia foram avaliados ao longo de uma semana e os murganhos sacrificados quando atingido o pico máximo de parasitemia. Com vista à purificação do parasita, as amostras do sangue colhido foram submetidas a cromatografia de troca aniónica numa coluna de DEAE-sefarose como representado na Figura 13.

Figura 13 - Purificação das formas sanguíneas de *T. b. brucei* (Retirado de [129]).

Adicionalmente, foram produzidos soros policlonais monoespecíficos contra os extratos proteicos de *L. amazonensis, L. guyanensis*, *L. infantum*, *L. shawi*, *T. cruzi* Y e *T. b. brucei*, por imunização de murganhos Balb/C. A imunização decorreu em três etapas com intervalos de tempo de um mês, duas semanas e uma semana, altura em que se procedeu ao sacrifício dos murganhos. Em cada uma das imunizações, os antigénios foram inoculados com um volume não superior a 200 µL, constituído por uma emulsão composta por 100 µg de extrato proteico total do parasita e um volume final de adjuvante equivalente, a um volume final de injeção não superior a 200 µL. A preparação antigénica foi administrada pela via subcutânea.

Foram utilizados dois adjuvantes, um completo e outro incompleto, ambos constituídos por óleos naturais/parafinas mas que diferem no facto de o ACF apresentar também na sua composição partículas de *Micobacterium tuberculosis*. A presença deste patogéneo torna o adjuvante completo, utilizado apenas na primeira imunização, mais imunogénico e tóxico. Na segunda e terceira imunização, foi utilizado AIF [118].

Ao longo do processo de imunização, amostras de sangue dos murganhos foram analisadas de forma a determinar os títulos de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, anti-*T. cruzi* e anti-*T. b. brucei.* As amostras foram colhidas quinze dias após a primeira imunização e uma semana após a segunda e terceira imunizações. Ao fim da terceira imunização e após o sacrifício dos animais, o sangue colhido foi centrifugado para obtenção e recolha do soro. Quando necessário, o soro foi descongelado à temperatura ambiente e um *pool* de diferentes grupos de soro (provenientes de diferentes imunizações) foi utilizado para a determinação de anticorpos anti-*Leishmania* spp., anti-*T. cruzi* e anti-*T. b. brucei*.

Os resultados obtidos na caracterização dos anticorpos policlonais IgG monoespecíficos nos ensaios de ELISA encontram-se apresentados na Figura 14 e Figura 15, e basearam-se na reação imuno-enzimática dos anticorpos policlonais monoespecíficos de cada espécie de parasita e os respetivos extratos proteicos. Nos gráficos apresentados nas figuras seguintes, os resultados encontram-se expressos pela relação do inverso da diluição do soro policlonal em função da sua absorvância (densidade ótica - DO) a um comprimento de onda de 490nm.

Verifica-se, na Figura 14 e Figura 15, que os soros policlonais monoespecíficos apresentaram valores de DO elevados (títulos superiores a 3200 para todos os soros policlonais) quando comparados com os soros obtidos dos animais não imunizados (grupo de controlo negativo),

evidenciando a presença de anticorpos anti-*Leishmania*, anti-*T. cruzi* e anti-*T. b. brucei* da classe IgG nos soros policlonais produzidos pelo processo de imunização utilizando os extratos proteicos de cada parasita.

A caracterização dos anticorpos policlonais anti-*Leishmania* encontra-se apresentada na Figura 14. Observa-se que os anticorpos policlonais anti-*L. amazonensis*, anti-*L. guyanensis* e anti-*L. infantum* (representados na Figura 14 A, B e C) apresentam perfis de reatividade serológica bastantes idênticos. No entanto, o perfil de reatividade serológica do anticorpo policlonal anti-*L. shawi* é bastante superior conforme apresentado na Figura 14 (D). O título de anticorpos anti-*L. shawi*, determinado em função do inverso da diluição do soro policlonal anti-*L. shawi*, foi apenas mensurável a partir da diluição 1/1600, uma vez que para menores diluições os valores de DO eram superiores a 3,5. A sua elevada reatividade relativamente às restantes espécies de Leishmania poderá dever-se a uma maior expressão dos antigénios presentes no seu extrato proteico ou expressão de antigénios mais imunogénicos.

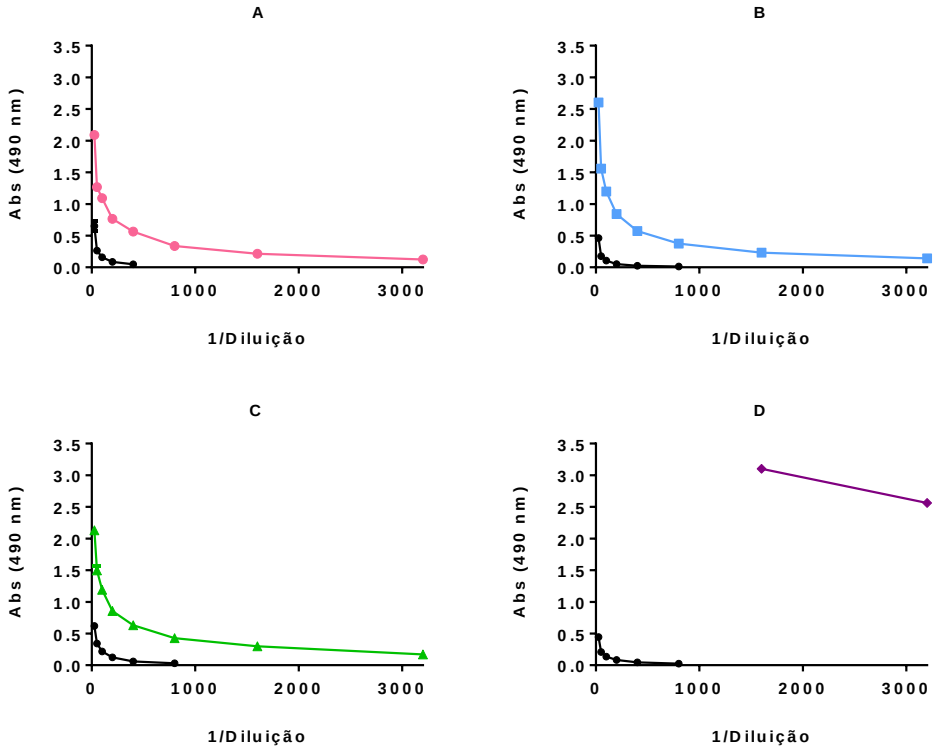

Figura 14 - Reatividade especifica dos anticorpos policlonais anti-*Leishmania* spp. produzidos frente aos respetivos extratos. A - *L. amazonensis*; B - *L. guyanensis;* C - *L. infantum;* D - *L. shawi;* Respetivos controlos negativos representados a preto.

Relativamente aos anticorpos policlonais anti-*T. cruzi* e anti-*T. b. brucei* apresentados na Figura 15, constata-se que os perfis de reatividade serológica observados são superiores aos observados para os anticorpos policlonais anti-*L. amazonensis*, anti-*L. guyanensis* e anti-*L. infantum*. O elevado título de anticorpos dos soros policlonais anti-*T. cruzi* e anti-*T. b. brucei* poderá ser uma consequência da própria constituição dos extratos proteicos e do tipo de antigénios que estes apresentam, nomeadamente a maior expressão de determinadas proteínas.

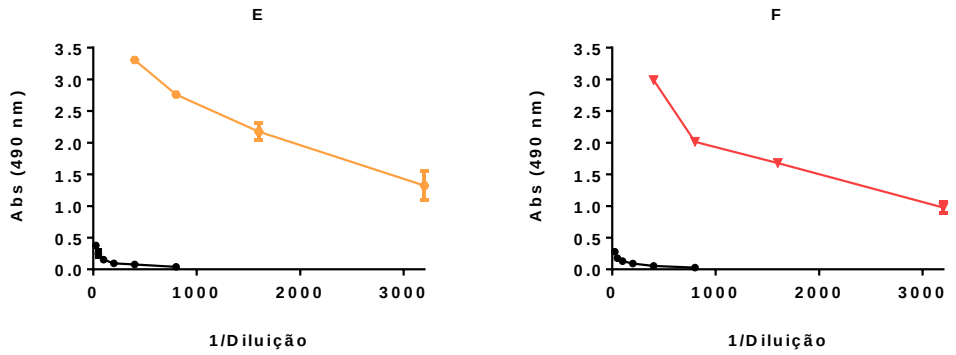

Figura 15 - Reatividade especifica dos anticorpos policlonais anti-*T.cruzi* e anti-*T. b. brucei* produzidos frente aos respetivos extratos. A – *Trypanosoma cruzi Y*; B – *Trypanosoma brucei brucei*; Respetivos controlos negativos representados a preto.

4.2 Reatividade serológica cruzada entre os diferentes anticorpos policlonais

Utilizando os anticorpos policlonais monoespecíficos anti-*Leishmania* spp., anti-*T. cruzi* e anti-*T. b. brucei* produzidos e os extratos proteicos parasitários foi possível, e uma vez mais recorrendo a ensaios de ELISA, estudar e avaliar a reatividade específica e cruzada e estabelecer comparações entre as diferentes espécies de *Leishmania*, entre *T. cruzi* Y e *T. b. brucei* e entre todos os tripanosomatídeos.

A Figura 16 apresenta os resultados das reações específicas e cruzadas entre as quatro espécies de *Leishmania* em estudo. Conforme esperado, constata-se que quando comparada com a reatividade dos soros obtidos dos animais do grupo de controlo, a reatividade especifica dos anticorpos policlonais anti-*Leishmania* foi, em todos os ensaios, superior, com valores de DO superiores a 0,5 até diluições de 1/400. Por comparação com a reatividade cruzada entre as quatro espécies de *Leishmania*, a reatividade específica dos policlonais anti-*L. amazonensis,* anti-*L. guyanensis*, anti-*L. infantum*, anti-*L. shawi* mostrou-se idêntica ou superior. A elevada reatividade serológica observada em cada ensaio, equivalente a controlos positivos bem reativos, a par de um total de controlos negativos com valores residuais, asseguram a validade dos resultados apresentados.

Verifica-se ainda, que o perfil de reatividade observado é transversal a todas as espécies. Neste, os títulos encontram-se expressos em diluição constatando-se que a títulos superiores correspondem diluições menores e valores de DO superiores.

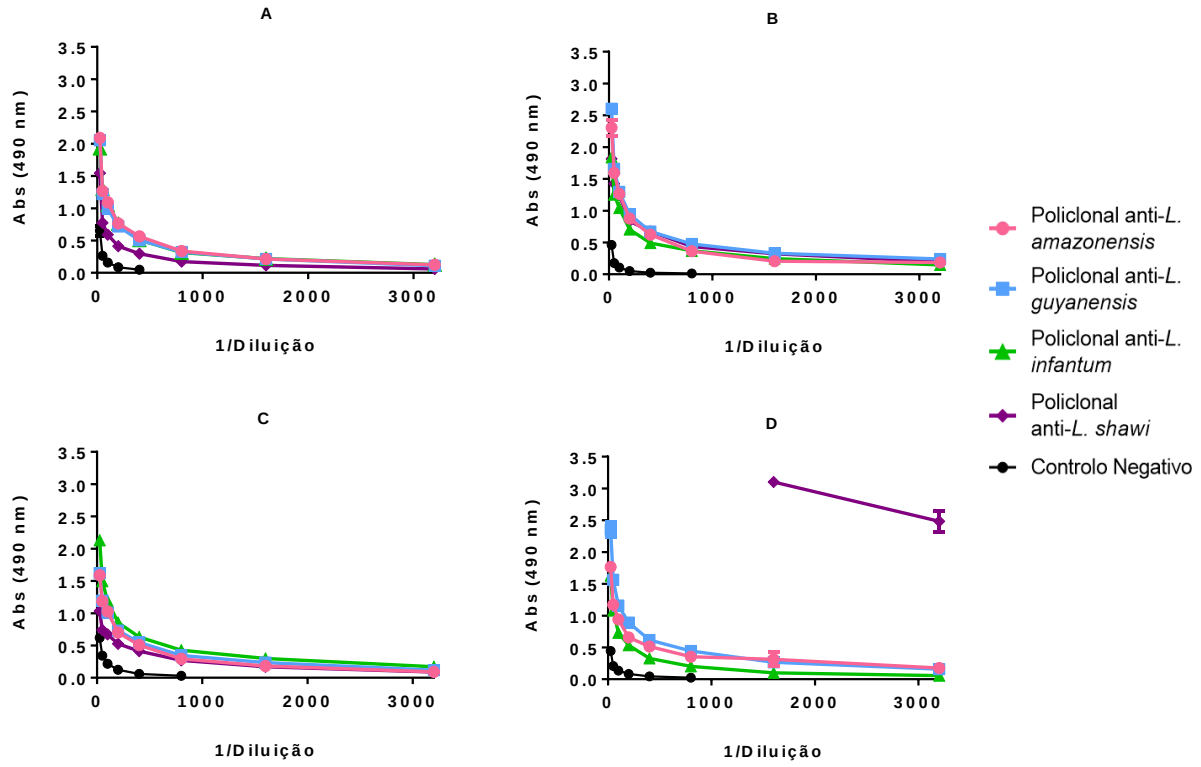

Figura 16 - Reatividade cruzada e específica dos anticorpos policlonais anti-*Leishmania* spp. frente aos extratos de *Leishmania* spp. A – Extrato *L. amazonensis*; B – *Extrato L. guyanensis*; C – Extrato *L. infantum*; D – Extrato *L. shawi*; Respetivos controlos negativos representados a preto.

Numa análise descritiva dos dados obtidos na Figura 16, verifica-se que a reatividade específica do anticorpo policlonal anti-*L. shawi* é bastante elevada comparativamente com a das restantes espécies de *Leishmania*, apresentando, até uma diluição 1/800, valores de DO superiores a 3,5,. Por outro lado a reatividade cruzada do anticorpo policlonal anti-*L. shawi* frente aos extratos parasitários de *L. amazonensis* e *L. infantum* apresenta valores de DO inferiores aos apresentados pela reatividade cruzada entre as restantes espécies de Leishmania. A ligeira diferença observada poderá estar relacionada com o facto de *L. shawi* pertencer ao sub-género *Viannia* enquanto as espécies *amazonensis* e *infantum* fazem parte do sub-género *Leishmania*. Por oposição, quando cruzada *L. shawi* com *L. guyanensis*, verifica-se tanto no gráfico B como no gráfico D da Figura 16, uma maior reatividade cruzada derivada da maior afinidade entre as duas espécies uma vez que ambas compõem o sub-género *Viannia*, sendo responsáveis pela manifestação cutânea e mucocutânea da doença.

Na Figura 17, à semelhança do grupo de resultados anteriores, verifica-se, que os ensaios que visaram o estudo da reatividade específica e cruzada dos anticorpos policlonais anti-*T. cruzi* e anti-*T. b. brucei* foram, com base nos baixos valores dos grupos de controlo e predominante atividade das reações específicas, devidamente executados. Apresentam ainda o perfil de curva esperado, com a diminuição da absorvância à medida que a diluição dos anticorpos policlonais aumenta.

Pela justaposição dos gráficos A e B da Figura 17, conclui-se que a reatividade serológica específica dos anticorpos policlonais anti-*T. cruzi* e anti-*T. b. brucei* apresenta títulos de anticorpos

similarmente elevados (densidade óticas superiores a 1 até uma diluição dos soros policlonais de 1/3200) pelo que é apenas mensurável a partir de diluições de anticorpo policlonal superiores a 1/400. No que respeita à reatividade cruzada entre *T. cruzi* e *T. b. brucei*, verifica-se um maior reconhecimento do anticorpo policlonal anti-*T. b. brucei* pelo extrato proteico total de *T. cruzi* Y, conforme exposto na Figura 17A.

Comparativamente à reatividade cruzada verificada entre as quatros espécies de *Leishmania*, a reatividade cruzada entre *T. cruzi* e *T. b. brucei* apresenta-se inferior, contudo há que ter em conta as diferenças inerentes ao facto de se tratar de dois parasitas distintos. Stevens e colaboradores (1999) sugerem que *T. cruzi* e *T. b. brucei* têm origens diferentes e fundamentalmente diferentes padrões de evolução [119]. Para além disto estão ainda demonstradas diferenças no modo de transmissão e de infeção que resultam em ciclos de vida diferentes e doenças clinicamente pouco relacionadas [120,121].

Por outro lado, é ainda de salientar o facto de o anticorpo policlonal anti-*T. b, brucei* ter sido produzido frente a extrato de formas tripomastigotas sanguíneas deste parasita e o anticorpo policonal anti-*T. cruzi* produzido frente a extrato de formas epimastigotas presentes no tubo digestivo do vetor e ainda assim existir reconhecimento cruzado por ambos os soros policlonais.

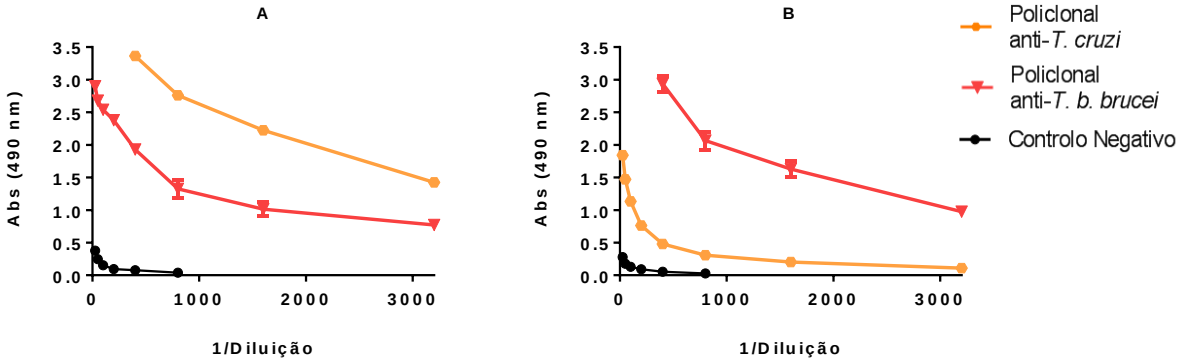

Figura 17 - Reatividade cruzada e específica dos anticorpos policlonais anti-*T.cruzi* e anti-*T. b. brucei* frente a cada um dos extratos. A – Extrato *T. cruzi* Y; B – Extrato *T. b. brucei;* Respetivos controlos negativos representados a preto.

Nos ensaios apresentados na Figura 18, encontra-se graficamente representada a reatividade serológica dos anticorpos policlonais anti-*T. cruzi* e anti-*T. b. brucei* frente aos extratos proteicos de *Leishmania* spp. (Figura 18 A a D) e dos anticorpos policlonais anti-*Leishmania* spp. frente ao extrato proteico de *T. cruzi* Y (Figura 18E) e ao extrato proteico de *T. b. brucei* (Figura 18F).

Verifica-se um reconhecimento dos extratos proteicos das diferentes espécies de *Leishmania* pelo policlonal anti-*T. b. brucei*, contudo os níveis de reatividade são, e como seria de esperar uma vez tratar-se de parasitas diferentes, inferiores aos apresentados na Figura 16 onde se encontra representada a reatividade cruzada entre as espécies de *Leishmania*. Relativamente ao policlonal anti-*T. cruzi*, a curva de reatividade apresenta-se próxima da curva de reatividade dos grupos de controlo, indicando ausência de reconhecimento dos extratos parasitários de *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum* e *L. shawi*.

A partir da Figura 18E e Figura 18F, constata-se que nenhum dos anticorpos policlonais anti-*Leishmania* reconhece os extratos proteicos de *T. cruzi* Y e *T. b. brucei*, uma vez que apresentam uma reatividade idêntica à dos soros do grupo de controlo.

Os resultados descritos Figura 18 relativamente aos anticorpos anti-*T. cruzi* e anti-*Leishmania* não são concordantes com os já descritos na literatura, onde se encontra reportada a ocorrência de reações cruzadas entre Trypanosoma e *Leishmania* [7] e em particular entre *T. cruzi e Leishmania* [9,122–124].

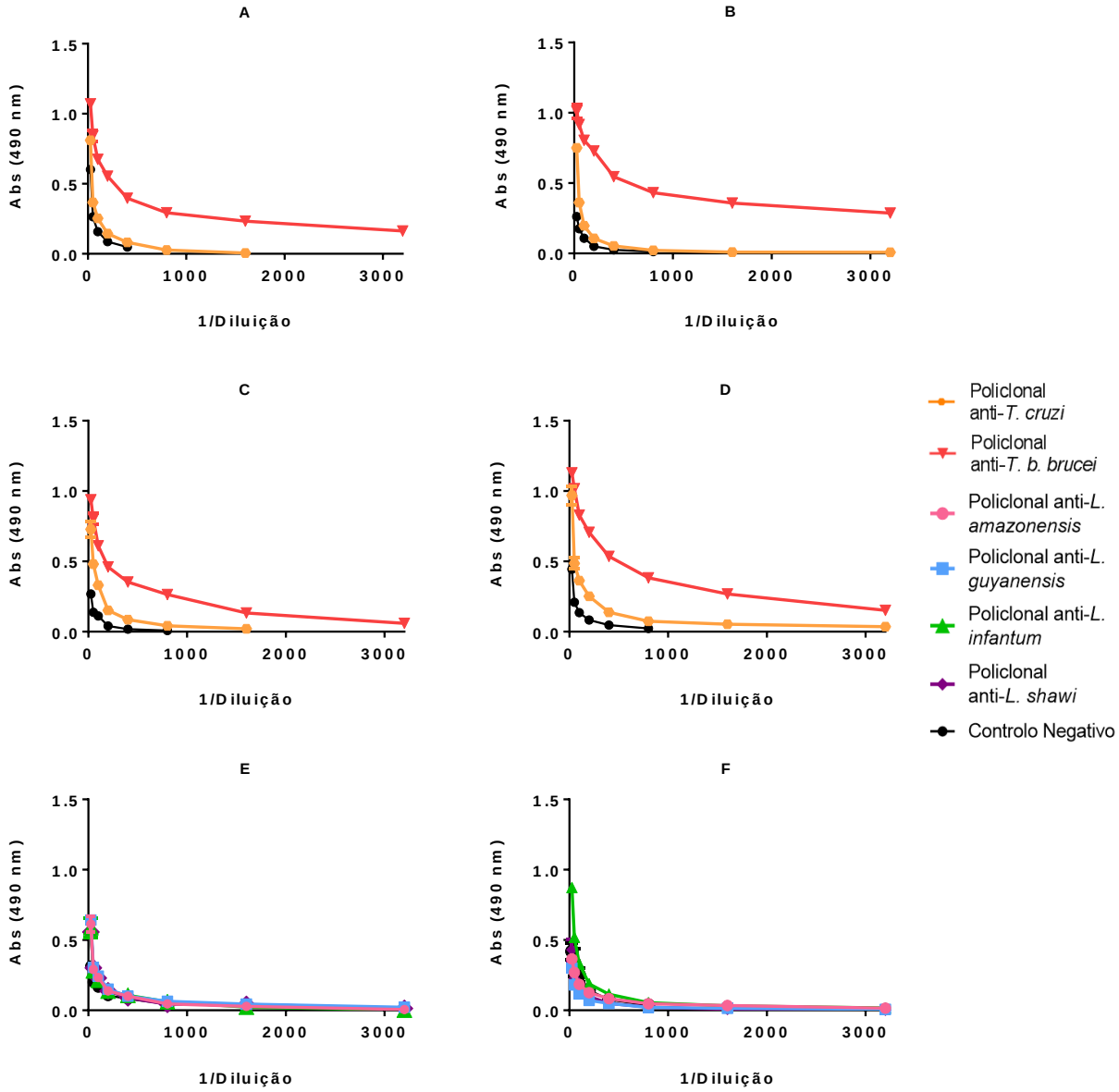

Figura 18 - Reatividade cruzada dos policlonais anti-*Leishmania* spp, anti-*T. cruzi* e anti-*T. b. brucei* frente a cada um dos extratos parasitários. A – *L. amazonensis*; B – Extrato *L. guyanensis;* C – Extrato *L. infantum*; D – Extrato *L. shawi*; E – Extrato *T. cruzi* Y; F – Extrato *T. b. brucei;* Respetivos controlos negativos representados a preto.

4.3 Caracterização dos antigénios envolvidos na reatividade serológica específica e na reatividade serológica cruzada entre os diferentes tripanosomatídeos

Confirmada a existência de reatividade serológica especifica e cruzada entre tripanosomatídeos procurou-se identificar os antigénios responsáveis pelas reações cruzadas recorrendo à técnica de *immunoblotting*. Nestes ensaios optou-se, em detrimento de soros policlonais, pela utilização de soros de infeções natural e experimental dada a possibilidade de adequação dos resultados ao contexto clínico.

Testaram-se 3 soros de infeção natural por *L. infantum* em canídeos, 3 soros de infeção natural por *T. cruzi* em indivíduos provenientes do Brasil e 2 soros de infeção experimental por *T. b. brucei* obtidos 7 e 35 dias após infeção de murganhos BALB/c.

Todos os extratos parasitários foram testados frente aos soros de infeção anteriormente referenciados, tendo sido utilizado como controlo positivo, um anticorpo policlonal específico de cada extrato utilizado nos ensaios de ELISA anteriores, e como controlo negativo um soro proveniente de indivíduos saudáveis, que possibilita a deteção de reações inespecíficas.

Em função das recomendações estipuladas nos protocolos pré-estabelecidos no laboratório, e com base em estudos anteriores da reatividade serológica dos soros policlonais, estabeleceu-se, como ideal, a diluição 1:100 dos soros a testar.

Relativamente à análise dos resultados observa-se, nas tiras correspondentes ao controlo positivo da Figura 19 e Figura 20, um perfil proteico característico da reação de cada um dos extratos com os respetivos soros policlonais (anti-*Leishmania* spp., anti-*T.cruzi* e anti-*T. b. brucei*). Adicionalmente, a ausência de bandas nas tiras correspondentes ao controlo negativo da Figura 19 e da Figura 20, atesta a validade dos ensaios, uma vez que não se verifica reatividade antigénica com as proteínas dos soros de infeção utilizados, garantindo-se a ausência de reações inespecíficas.

No conjunto de resultados referentes aos soros de infeção experimental com *T. b. brucei* não se verifica a existência de bandas, conforme se observa nas tiras 7 e 8 das membranas de cada um dos parasitas (Figura 19 e Figura 20). A ausência de reconhecimento das proteínas que compõem os diferentes extratos parasitários pelos soros em questão, poderá dever-se a um baixo título de anticorpos, pressuposto posteriormente confirmado por ELISA. Os resultados negativos apresentados relativamente à reatividade cruzada com soros de infeção por *T. b. brucei* não podem, todavia, ser complementados ou refutados pela literatura dada ausência de estudos nesta área. O estudo da reatividade cruzada associada a este parasita reveste-se de especial dificuldade devido à variabilidade antigénica que lhe é inerente. Autores, como Donelson (2003) exploram, em formato de revisão bibliográfica, esta sua característica de alternância da principal glicoproteína de superfície [125].

Contrariamente aos soros de infeção por *T. b. brucei*, os soros referentes às infeções com *L. infantum* e *T. cruzi* revelaram-se reativos tanto a nível específico como cruzado, sendo possível observar na Figura 19 e 20 as proteínas detetadas nos vários ensaios *immunoblotting*.

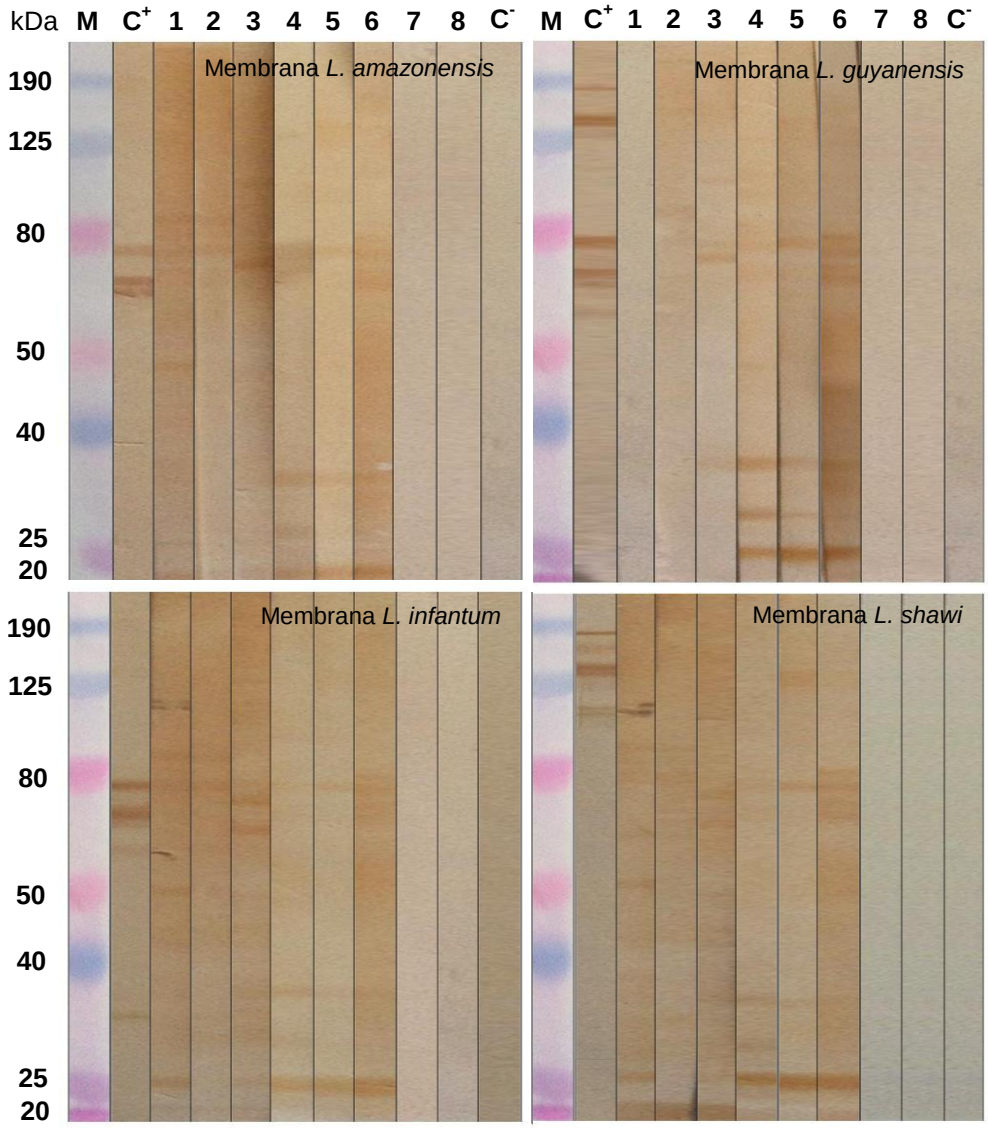

Figura 19 – Resultados das reações de *immunoblotting* nas membranas revestidas com extrato de *Leishmania* spp. M – marcador de massas moleculares; C^+ - controlo positivo; Tira 1, 2 e 3 – Soros de infeção por *L. infantum*; Tira 4, 5 e 6 – Soros de infeção por *T. cruzi*; Tira 7 e 8 – Soros de infeção por *T. b. brucei*; C^- - controlo negativo.

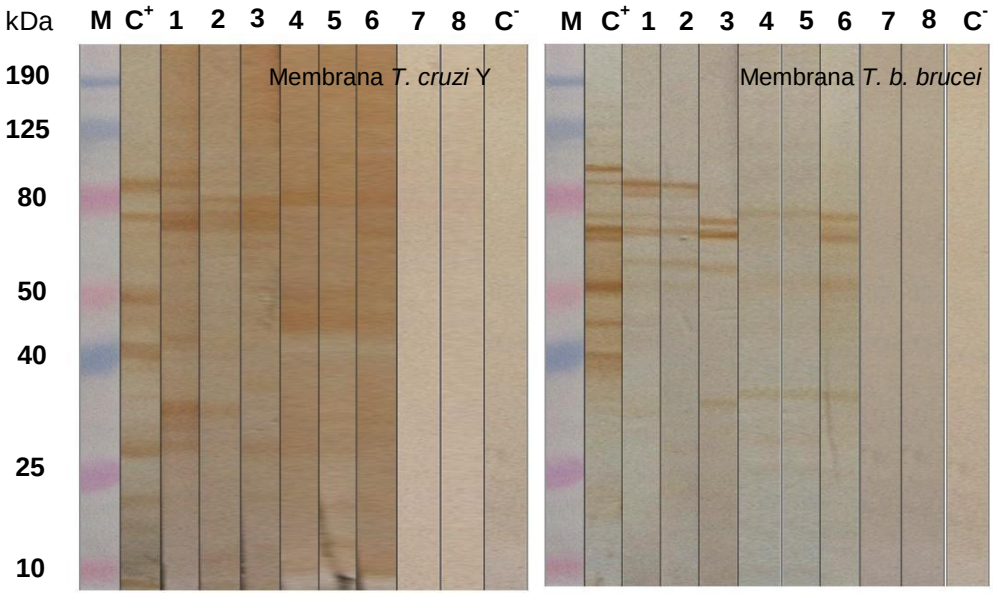

Figura 20 - Resultados das reações de *immunoblotting* nas membranas revestidas com extrato de *T. cruzi* Y e *T. b. brucei*. M – marcador de massas moleculares; C^+ - controlo positivo; Tira 1, 2 e 3 – Soros de infeção por *L. infantum*; Tira 4, 5 e 6 – Soros de infeção por *T. cruzi*; Tira 7 e 8 – Soros de infeção por *T. b. brucei*; C^- - controlo negativo.

Na Tabela 3, encontram-se resumidas as proteínas reconhecidas nos extratos proteicos das quatro espécies de *Leishmania*, pelos soros policlonais produzidos por imunização e utilizados anteriormente nos ensaios de ELISA (equivalentes ao controlo positivo) e pelo conjunto dos três soros de infeção por *L. infantum* em canídeos.

Para *L. amazonensis*, verifica-se um reconhecimento pelo soro policlonal anti-*L. amazonensis* de antigénios com massas moleculares na gama dos 80 a 65kDa (Figura 19 Membrana *L. amazonensis*, tira C^+). Já os soros de infeção por *L. infantum*, para além de detetarem proteínas na gama de massas moleculares referida anteriormente, reconhecem uma proteína de massa molecular superior a 80kDa e duas proteínas coincidentes com o marcador de massas moleculares de 25 e 20kDa (Figura 19 Membrana *L. amazonensis*, tiras 1, 2 e 3).

Quando analisado o extrato de *L. guyanensis*, observa-se que o soro policlonal anti-*L. guyanensis* reconhece proteínas com massas moleculares superiores a 125kDa e na gama dos 80 a 60kDa (Figura 19 Membrana *L. guyanensis*, tira C^+). O soro de infeção por *L. infantum*, reconhece uma das proteínas de massa molecular superior a 125kDa, proteínas com massa moleculares na gama dos 90 a 70kDa e ainda uma proteína com massa molecular entre os 25 e os 40kDa (Figura 19 Membrana *L. guyanensis*, tiras 1, 2 e 3).

O soro policlonal anti-*L. infantum* reconhece no extrato com o qual foi produzido, proteínas na gama de massas moleculares de 60 a 80kDa e uma proteína na gama de massas moleculares de 40 a 50kDa (Figura 19 Membrana *L. infantum*, tira C^+). O soro de infeção por *L. infantum*, deteta proteínas de massa molecular na gama dos 70 aos 90kDa, dos 40 aos 50kDa e duas proteínas coincidentes com o marcador de massas moleculares de 25 e 20kDa (Figura 19 Membrana *L. infantum*, tira 1, 2 e 3).

Para *L. shawi,* a reatividade serológica específica apresenta um perfil de reatividade relativamente diferente ao das restantes espécies de *Leishmania*. O soro policlonal anti-*L. shawi* reconhece proteínas de massas moleculares elevados, na gama dos 100 aos 190kDa Figura 19 Membrana *L. shawi*, tira C^+). Quando analisada a reatividade com o soro de infeção por *L. infantum*, verifica-se um perfil de reatividade muito idêntico ao verificado anteriormente para o extrato de *L. infantum*, sendo reconhecidas proteínas de massa molecular na gama dos 70 aos 90kDa, dos 40 aos 50kDa e duas proteínas coincidentes com o marcador de massas moleculares de 25 e 20kDa Figura 19 Membrana *L. shawi*, tira 1, 2 e 3).

Através do marcador de massa molecular utilizado, é possível fazer uma estimativa da massa molecular dos antigénios detetados. É de realçar o facto de o cálculo do massa molecular poder conter algum erro e por isso trata-se apenas de uma aproximação ao valor real.

Outra consideração a ter em conta é a possibilidade das bandas de menor massa molecular (como, por exemplo, as de 28, 25 e 20kDa) representarem frações degradadas das proteínas de maior massa molecular. A degradação pode ter ocorrido durante os processos de descongelamento do extrato, apesar de terem sido tomadas precauções adequadas.

Tabela 3 – Proteínas antigénicas detetadas nos extratos proteicos de *Leishmania* spp. pelos controlos positivos e soros de infeção por *L. infantum*.

Massas moleculares estimados (kDa)	**Extratos *Leishmania***							
	L. amazonensis		***L. guyanensis***		***L. infantum***		***L. shawi***	
	C^+	Soros infeção *L. infantum*	C^+	Soros infeção *L . infantum*	C^+	Soros infeção *L. infantum*	C^+	Soros infeção *L. infantum*
185								
166								
145								
142								
125								
113								
109								
88								
77								
70								
67								
60								
50								
44								
42								
35								
25								
20								

De acordo com a descrição feita anteriormente e com base na estimativa de massas moleculares realizada, as proteínas de 88, 77, 25 e 20kDa destacam-se uma vez que são detetadas pelos soros

de infeção por *L. infantum* na quase totalidade dos extratos proteicos parasitários de *Leishmania*, podendo ser considerados antigénios com reatividade cruzada entre as quatro espécies de *Leishmania*.

A deteção de antigénios com reatividade serológica apenas com soros de infeção *por L. infantum* e com potencial para o desenvolvimento de testes diagnósticos diferenciais, nomeadamente de leishmaniose visceral, reveste-se de particular dificuldade. Proteínas de massa molecular de 50, 44 e 42kDa são reconhecidas em extrato de *L. infantum* pelos soros de infeção por *L. infantum*, contudo estas proteínas são também reconhecidas em extratos de *L. shawi*, sendo uma vez mais incluídas nos antigénios de reatividade cruzada. Referir ainda a proteína de massa molecular 70kDa detetada pelo soro de infeção por *L. infantum* nos extratos de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*.

Alguns estudos descrevem antigénios anti-*L. infantum*, que constituem a base do diagnóstico serológico. Aisa e colaboradores (1998) analisaram por *western blott* um conjunto de 72 soros de cães infetados com *L. infantum*, verificando um padrão onde se destacam os antigénios de massa molecular 70, 65, 46, 30 28, 14 e 12kDa [126]. Mary C. e colaboradores (1992), verificaram que antigénios de massa molecular de 68, 46, 30, 28, 16, 14kDa são reconhecidos por soros de pacientes com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral [127]. Analisando apenas a reatividade serológica do extrato de *L. infantum*, verifica-se, no conjunto dos soros de infeção por *L. infantum* e do soro policlonal anti-*L. infantum*, a deteção dos antigénios de massa molecular 88, 77, 70, 67, 60, 50, 44, 42, 35, 25 e 20kDa. Alguns destes antigénios poderão corresponder aos antigénios identificados nos estudos anteriores, nomeadamente os de 70, 67, 44, 35 e 25kDa, já que existe sempre um erro associado ao cálculo de massa molecular. Contudo e tendo em conta a análise feita neste trabalho verifica-se que apesar do seu potencial para utilização no diagnóstico de leishmaniose visceral, estes antigénios apresentam reatividade serológica cruzada com as restantes espécies de Leishmania.

Relativamente à reatividade serológica entre *T. cruzi* e *T. b. brucei*, a mesma análise pode ser feita tendo em conta a Tabela 4, onde se encontram representadas as proteínas detetadas pelos soros policlonais anti-*T.cruzi* e anti-*T. b. brucei* (equivalentes ao controlo positivo) e pelo conjunto de soros de pacientes com diagnóstico positivo para a doença de Chagas.

Uma vez que os soros de infeção experimental com *T. b. brucei* em murganhos, não apresentaram reatividade serológica, para *T. cruzi* apenas será feita inicialmente uma descrição do perfil proteico dos extratos frente ao soro policlonal anti-*T.cruzi* e ao conjunto de soros de infeção por *T. cruzi* não sendo possível definir antigénios com reatividade serológica cruzada com *T. b. brucei*. O soro policlonal anti-*T. cruzi*, deteta proteínas com massas moleculares de aproximadamente 87, 75, 71, 50, 47, 44, 28 e 20kDa (Figura 20, Membrana *T. cruzi* Y, tira C^+), destas, as proteínas de massas moleculares de 50, 47, 28 e 20kDa são detetadas pelo soro de infeção por *T. cruzi* que ainda reconhece uma proteína com massa molecular de 80kDa (Figura 20, Membrana *T. cruzi* Y, tiras 4, 5 e 6).

Um estudo anterior do nosso grupo de investigação identificou um padrão de reatividade num conjunto de 28 soros de pacientes chagásicos residentes na europa que incluía quatro zonas de reatividade: 15-20kDa, 25-30kDa, 40-50kDa e 80-125kDa, coincidentes com as zonas de reatividade observadas neste trabalho [128]. Outros estudos descrevem proteínas com massas moleculares

semelhantes às identificadas neste trabalho, nomeadamente: microtubule-associated protein e trypomastigote surface protein de 85kDa e ribossomal protein de 35kDa usadas no diagnóstico de infeções crónicas. Adicionalmente, são ainda descritas flagellar Ca^{2+} binding protein de 24 kDa e heat shock protein de 70 kDa para monotorização da cura de infeções crónicas [10].

CRA de 225kDa e FRA de 300kDa têm sido utilizados no diagnóstico de doença de Chagas com resultados bastante satisfatórios ao nível de sensibilidade e especificidade, no entanto neste estudo não foi possível identificar proteínas com massa molecular superior a 125kDa provavelmente devido ao facto de estarem a ser usados soros de pacientes na fase crónica da doença de Chagas onde estes antigénios não estão presentes [10]. Seria importante a realização de uma pesquisa futura de forma a esclarecer se a fase aguda e a fase crónica apresentam diferenças relativamente aos antigénios envolvidos. Uma vez mais, e como será verificado mais à frente, alguns destes antigénios apresentam também reatividade serológica cruzada nomeadamente com *Leishmania* spp..

O soro policlonal anti-*T. b. brucei* apresenta uma zona de reatividade entre os 125 a 90kDa, onde se identificaram proteínas de massas moleculares de aproximadamente 125, 118, 100 e 92kDa (Figura 20, Membrana *T. b. brucei*, tira C^+). Para além disso foram ainda detetadas proteínas de massa molecular de aproximadamente 77, 71, 54, 47 e 40kDa. Como antigénios com reatividade serológica cruzada, detetados pelos soros de infeção por *T. cruzi* no extrato proteico de *T. b. brucei*, destacam-se os antigénios de massa molecular de aproximadamente 118, 77, 54, 47 e 36kDa (Figura 20, Membrana *T. b. brucei*, tiras 4, 5 e 6).

Tabela 4 – Proteínas antigénicas detetadas nos extratos proteicos de *T. cruzi* Y *e T. b. brucei* pelos controlos positivos, soros de infeção por *T. cruzi* e soros de infeção por *T. b. brucei.*

PM estimados (kDa)	Extratos					
	T. cruzi			***T. b. brucei***		
	C^+	Soros infeção T.cruzi	Soros infeção *T. b .brucei*	C^+	Soros infeção T.cruzi	Soros infeção *T. b .brucei*
125			Soros de infeção por *T. b. brucei* sem reatividade			Soros de infeção por *T. b. brucei* sem reatividade
118						
100						
92						
87						
80						
77						
75						
71						
54						
50						
47						
44						
40						
36						
28						
20						

Para analisar e identificar os antigénios responsáveis pela reatividade serológica entre *Leishmania, T. cruzi* e *T. b. brucei*, tiveram-se em consideração antigénios presentes nos extratos proteicos totais de *Leishmania* spp. reconhecidos pelos soros de infeção por *T. cruzi*, antigénios presentes no extrato proteico total de *T. cruzi* e no extrato proteico total de *T. b. brucei* reconhecidos pelos soros de infeção por *L. infantum*. Os antigénios presentes em extrato de *T. b. brucei* reconhecidos pelos soros de infeção por *T. cruzi* tinham já sido considerados anteriormente.

Tabela 5 – Proteínas antigénicas detetadas nos extratos proteicos de *Leishmania* spp. pelos soros de infeção por *T. cruzi* e nos extratos proteicos de *T. cruzi* e *T. b. brucei* pelos soros de infeção por *L. infantum.*

PM estimados (kDa)	**Extratos**					
	L. amaz	***L. guyanensis***	***L. infantum***	***L. shawi***	***T. cruzi***	***T. b. brucei***
	Soros infeção *T.cruzi*	Soros infeção *T.cruzi*	Soros infeção *T.cruzi*	Soros infeção *T.cruzi*	Soros infeção *Linf*	Soros infeção *L infantum*
125						
88						
80						
77						
75						
70						
67						
60						
54						
35						
30						
25						
20						

Relativamente a *Leishmania spp.*, os antigénios de massas moleculares de aproximadamente 77, 35 e 25kDa foram detetados pelos soros de infeção por *T. cruzi* nos extratos proteicos de todas as espécies de *Leishmania* em estudo, podendo ser considerados antigénios com reatividade serológica cruzada. Para além dos antigénios já destacados, outras proteínas apresentaram reatividade serológica cruzada contudo esta reatividade não foi transversal a todos os extratos. No extrato proteico de *L. amazonensis* foi ainda reconhecida a proteína de massa molecular de aproximadamente 20kDa (Figura 19 Membrana *L. amazonensis*, tiras 4, 5 e 6), no extrato proteico de *L. guyanensis* (Figura 19 Membrana *L. guyanensis*, tiras 4, 5 e 6) as proteínas de massa molecular de aproximadamente 125, 70, 67 e 30kDa e no extrato proteico de *L. infantum* (Figura 19 Membrana *L. infantum*, tiras 4, 5 e 6) a proteína de aproximadamente 30kDa.

No extrato proteico de *T. cruzi*, os soros de infeção por *L. infantum* foram capazes de reconhecer proteínas de massa molecular de aproximadamente 80, 75, 70, 35 e 20kDa (Figura 20, Membrana *T. cruzi* Y, tiras 1, 2 e 3).

Por último, verificou-se que em extrato proteico de *T. b. brucei* os soros de infeção por *L. infantum* (Figura 20 Membrana *T. b. brucei,* tiras 1, 2 e 3) reconheceram os antigénios de massa molecular de aproximadamente 88, 80, 77, 75, 60 e 54kDa.

Ao contrário do observado nos ensaios de ELISA, nestes ensaios foi possível a deteção de proteínas com reatividade serológica cruzada entre as três populações de tripanosomatídeos, derivada do facto de o immunoblotting apresentar uma maior sensibilidade comparativamente à técnica de ELISA.

A ausência de resultados referentes à reatividade serológica dos soros de infeção por *T. b. brucei* com os extratos proteicos de *Leishmania* spp. e *T. cruzi*, impossibilitou a identificação de um potencial candidato antigénico ao desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o trio de doenças associadas aos parasitas em questão. Não obstante as limitações decorrentes desta situação, é legítima a exploração das proteínas identificadas que poderão servir como referência em trabalhos futuros, os quais deverão contemplar um maior número de amostras (soros de infeção) para aferir a reprodutibilidade dos resultados.

Por último referir que em alguns laboratórios é habitual utilizar elevadas diluições dos soros de forma a evitar a reatividade cruzada. Neste trabalho utilizou-se apenas uma diluição, contudo noutros estudos foram utilizadas várias diluições que permitiram concluir que o uso de elevadas diluições de modo a evitar a reatividade cruzada é inapropriado [9].

Capítulo 5 – Conclusões e Perspetivas Futuras

O trabalho desenvolvido visava a determinação e identificação de antigénios comuns às três populações de tripanosomatídeos e, por consequência, responsáveis pela reatividade serológica cruzada entre *Leishmania* spp*., Trypanosoma cruzi e Trypanosoma brucei brucei*.

Numa primeira fase, foram utilizados e caracterizados soros policlonais anti-*Leishmania*, anti-*T. cruzi* e anti-*T. b. brucei* produzidos por imunização de murganhos Balb/C, o que permitiu a caracterização da reatividade serológica por meio de ensaios de ELISA. Estes ensaios comprovaram a existência de reatividade cruzada entre os três tripanosomatídeos e mostraram ainda, como era expetável, uma reatividade serológica específica superior. Verificou-se uma maior reatividade cruzada entre as quatros espécies de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum* e *L. shawi*) e entre *T. cruzi* e *T. b. brucei.*

Pela análise dos perfis proteicos obtidos por *immunoblotting*, identificaram-se os antigénios responsáveis pela reatividade serológica cruzada entre as espécies de *Leishmania*, onde se destacaram os antigénios de massa molecular de aproximadamente 88, 77, 25 e 20kDa; os antigénios responsáveis pela reatividade serológica cruzada entre *T. cruzi* e *T. b. brucei* de massa molecular de aproximadamente 118, 77, 54, 47 e 36kDa; os antigénios com reatividade serológica cruzada entre *T. cruzi* e *Leishmania* de massa molecular de aproximadamente 80, 77, 75, 35, 25 e 20kDa e os antigénios com reatividade serológica cruzada entre *Leishmania* spp. e *T. b. brucei* de massa molecular de aproximadamente 88, 80, 77, 75, 60 e 54kDa.

De forma a complementar o trabalho desenvolvido, sugere-se realizar futuramente a sequenciação dos principais antigénios detetados e envolvidos na reatividade serológica cruzada entre os três tripanosomatídeos. Espera-se que os resultados de uma análise *in silico* contribuam para a procura e identificação de novos alvos antigénios, que por sua vez poderão ser utilizados como marcadores serológicos em patologias causadas por tripanosomatídeos e no desenvolvimento de novos testes laboratoriais.

É importante ter em consideração que este estudo consiste apenas num modelo base para extrapolar resultados com base numa pequena amostra de soros de infeção, sendo relevante a validação deste modelo numa população com infeção natural.

De modo a melhorar os resultados obtidos, sugere-se a utilização de um maior número de soros de infeção representativos de cada uma das patologias e de zonas endémicas distintas. Isto contribuirá para a confirmação e validação do presente estudo e para a identificação de outras proteínas antigénicas responsáveis pela reatividade cruzada. Para além disto, seria útil a introdução de soros de infeção por *T. brucei* com uma reatividade suficientemente elevada, de modo a efetivamente identificar antigénios reativos aos extratos de *Leishmania* spp. e *T. cruzi.*

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

1. Morel, C. M. Innovation in health and neglected diseases. *Cadernos de Saúde Pública* 22**,** 1522–3 (2006).

2. World Health Organization. Neglected tropical diseases. (2015). at <http://www.who.int/neglected_diseases/en/>

3. Hickman, C. P., Roberts, L. S. & Larson, A. *Integrated Principles of Zoology*. (New York: McGraw Hill, 2001).

4. Teixeira, S. M., de Paiva, R. M. C., Kangussu-Marcolino, M. M. & DaRocha, W. D. Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. *Genetics and Molecular Biology* 35**,** 1–17 (2012).

5. H. Lopes, A. *et al.* Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. *The Open Parasitology Journal* 4**,** 30–59 (2010).

6. Santos, A. L. S., Abreu, C. M., Alviano, C. S. & Soares, R. M. A. Use of proteolytic enzymes as an additional tool for trypanosomatid identification. *Parasitology* 130**,** 79–88 (2005).

7. Camargo, M. E. & Rebonato, C. Cross-Reactivity in Fluorescence Tests for Trypanosoma and Leishmania Antibodies: A Simple Inhibition Procedure to Ensure Specific Results. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18**,** 500–505 (1969).

8. Vexenat, A. D. C., Santana, J. M. & Teixeira, A. R. L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa - Vexenat.pdf. *Revista do Instituto de Medicinal Tropical de São Paulo* 38**,** 177–185 (1996).

9. Malchiodi, E. L., Chiaramonte, M. G., Taranto, N. J., Zwirner, N. W. & Margni, R. a. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by Trypanosoma cruzi and Leishmania spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). *Clinical and experimental immunology* 97**,** 417–423 (1994).

10. Da Silveira, J. F., Umezawa, E. S. & Luquetti, A. O. Chagas disease: recombinant Trypanosoma cruzi antigens for serological diagnosis. *Trends in Parasitology* 17**,** 286–291 (2001).

11. Cruvinel, W. D. M. *et al.* Immune system - Part I Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Revista Brasileira de Reumatologia* 50**,** 434–461 (2010).

12. Arosa, F. A., Cardoso, E. M. & Pacheco, F. C. *Fundamentos de Imunologia*. (2007).

13. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology*. (2012).

14. Júnior, D. M. *et al.* Immune System - Part II Basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Revista Brasileira de Reumatologia* 50**,** 552–580 (2010).

15. Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, H. H. e Z. R. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288**,** 2222–2226 (2000).

16. Galazka, A. *The immunological basis for immunization series. General Immunology. Department of Vaccines and Biologicals. World Health Organization.* (2001).

17. Garraud, O., Perraut, R., Riveau, G. & Nutman, T. B. Class and subclass selection in parasite-specific antibody responses. *Trends in Parasitology* 19**,** 300–307 (2003).

18. Jenkins, M. K. *et al.* In vivo activation of antigen-specific CD4 T Cells. *Annual Review of Immunology* 19**,** 23–45 (2001).

19. Dedet, J. . in *World Class Parasites: Volume 4 Leishmania* (ed. Farrell, J. .) (Kluwer Academic Publishers, London, 2002).

20. World Health Organization. *Research priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. World Health Organization technical report series* (2012).

21. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites - Leishmaniasis. (2013). at <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>

22. World Health Organization. Leishmaniasis. (2015). at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>

23. Dawit, G., Girma, Z. & K, S. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. *Journal of Bacteriology & Parasitology* 4**,** 1–7 (2013).

24. Tiuman, T. S., Santos, A. O., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. P. D. & Nakamura, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases* 15**,** 525–532 (2011).

25. Desjeux, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 27**,** 305–318 (2004).

26. Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. A. G. & Hassan, I. M. El. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet* 3**,** 87–98 (2003).

27. Nylén, S. & Gautam, S. Immunological Perspectives of Leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases* 2**,** 135–146 (2010).

28. Belkaid, Y. *et al.* A natural model of Leishmania major infection reveals a prolonged 'silent' phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165**,** 969–977 (2000).

29. Holzmuller, P., Bras-Gonçalves, R. & Lemesre, J. L. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in Leishmania. *Parasitology* 132**,** 19–32 (2006).

30. Bogdan, C. & Röllinghoff, M. The immune response to Leishmania: Mechanisms of parasite control and evasion. *International archives of allergy and applied immunologyJournal for Parasitology* 28**,** 121–134 (1998).

31. Lopez, R. *et al.* Circulating Immune Complexes and Renal Function in Canine Leishmaniasis. *Journal of Veterinary Medicine* 43**,** 469–474 (1996).

32. Isnard, A., Shio, M. T. & Olivier, M. Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2**,** 1–9 (2012).

33. Afrin, F. *et al.* Characterization of Leishmania donovani antigens encapsulated in liposomes that induce protective immunity in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 70**,** 6697–6706 (2002).

34. Melby, P. C. Leishmania donovani p36(LACK) DNA Vaccine Is Highly Immunogenic but Not Protective against Experimental Visceral Leishmaniasis. *Infection and Immunity* 69**,** 4719–4725 (2001).

35. Soussi, N. *et al.* Listeria monocytogenes as a short-lived delivery system for the induction of type 1 cell-mediated immunity against the p36/LACK antigen of Leishmania major. *Infection and Immunity* 68**,** 1498–1506 (2000).

36. Champsi, J. & McMahon-Pratt, D. Membrane glycoprotein M-2 protects against Leishmania amazonensis infection. *Infection and Immunity* 52**,** 3272–3279 (1988).

37. Ahmed, S. *et al.* Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity* 71**,** 401–410 (2003).

38. White, a. C. & McMahon-Pratt, D. Purification and characterization of an 80-kilodalton membrane protein from Leishmania donovani. *Infection and Immunity* 56**,** 2385–2391 (1988).

39. Bhatia, A. *et al.* Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of Leishmania chagasi. *Molecular and Biochemical Parasitology* 102**,** 249–261 (1999).

40. Martins, D. R. a, Jeronimo, S. M. B., Donelson, J. E. & Wilson, M. E. Leishmania chagasi T-cell Antigens Identified through a Double Library Screen. *Infection and Immunity* 74**,** 6940–6948 (2006).

41. Coler, R. N. *et al.* Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-cell antigens thiol-specific antioxidant, Leishmania major stress-inducible protein 1, and Leishmania elongation initiation factor protects against leishmaniasis. *Infection and Immunity* 70**,** 4215–4225 (2002).

42. D'Avila-Levy, C. M., Altoé, E. C. F., Uehara, L. A., Branquinha, M. H. & Santos, A. L. S. GP63 function in the interaction of trypanosomatids with the invertebrate host: facts and prospects. *Subcell Biochem* 74**,** 253–270 (2013).

43. Grandgenett, P. M., Coughlin, B. C., Kirchhoff, L. V. & Donelson, J. E. Differential expression of GP63 genes in Trypanosoma cruzi. Molecular and Biochemical Parasitology. *Molecular and Biochemical Parasitology* 110**,** 409–415 (2000).

44. Srivastava, P., Dayama, A., Mehrotra, S. & Sundar, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105**,** 1–6 (2011).

45. Matlashewski, G. *et al.* Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Bihar India: Comparison of the rK39 Rapid Diagnostic Test on Whole Blood Versus Serum. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7**,** 1–4 (2013).

46. Freitas-Junior, L. H., Chatelain, E., Kim, H. A. & Siqueira-Neto, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology* 2**,** 11–19 (2012).

47. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). (2015). at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

48. Rassi, A., Rassi, A. & Marcondes de Rezende, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America* 26**,** 275–291 (2012).

49. Teixeira, A. R. L., Nitz, N., Guimaro, M. C., Gomes, C. & Santos-Buch, C. A. Chagas disease. *Postgraduate medical journal* 82**,** 788–798 (2006).

50. Ribeiro, A. R. *et al.* Trypanosoma cruzi strains from triatomine collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista de Saude Publica* 48**,** 295–302 (2014).

51. Contreras A., V. T., De Lima R., A. R. & Navarro A., M. C. Trypanosoma Cruzi Morphogenesis : Relevant Factors for in Vitro Differentiation. *Acta Biologica Venezuelica* 26**,** 49–60 (2006).

52. Centers for Disease Control and Prevention. American Trypanosomiasis. (2013). at <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>

53. McCall, L. I. & McKerrow, J. H. Determinants of disease phenotype in trypanosomatid parasites. *Cell Press* 30**,** 342–349 (2014).

54. Schmunis, G. A. & Dias, J. C. P. Health system , decentralization , and the control of vector-borne diseases. *Cadernos de Saúde Pública* 16**,** 117–123 (2000).

55. Coura, J. R. & Viñas, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465**,** 6–7 (2010).

56. Rassi, A. J., Rassi, A. & Marin-Neto, J. A. Chagas disease. *The Lancet* 375**,** 1388–1402 (2010).

57. De Meis, J., Morrot, A., Farias-de-Oliveira, D. a., Villa-Verde, D. M. S. & Savino, W. Differential Regional Immune Response in Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3**,** (2009).

58. Andrade, D. V., Gollob, K. J. & Dutra, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8**,** 1–10 (2014).

59. Machado, J. R. *et al.* Immunopathological Aspects of Experimental Trypanosoma cruzi Reinfections. *BioMed Research International,* 2014**,** 1–9 (2014).

60. Ortiz-Ortiz, L., Ortega, T., Capín, R. & Martínez, T. Enhanced mononuclear phagocytic activity during Trypanosoma cruzi infection in mice. *International archives of allergy and applied immunology* 50**,** 232–242 (1976).

61. Cardillo, F., Voltarelli, J., Reed, S. & Silva, J. Regulation of Trypanosoma cruzi infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infection and Immunity* 64**,** 128–134 (1996).

62. Gazzinelli, R., Oswald, I. P., Hieny, S., James, S. L. & Sher, A. The microbicidal activity of interferon-γ-treated macrophages against Trypanosoma cruzi involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-β. *European Journal of Immunology* 22**,** 2501–2506 (1992).

63. Salvador, R., Aridgides, D. & PereiraPerrin, M. Parasite-Derived Neurotrophic Factor/trans-Sialidase of Trypanosoma cruzi Links Neurotrophic Signaling to Cardiac Innate Immune Response. *Infection and Immunity* 82**,** 3687–3696 (2014).

64. Câmara, P. P. M. & Navarro, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *Journal of Venomous Animals and Toxins incluing Tropical Diseases* 1–8 (2013).

65. Campos, Y. *et al.* Serological diagnosis of Chagas disease: evaluation and characterisation of a low cost antigen with high sensitivity and specificity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104**,** 914–917 (2009).

66. Goto, Y., Carter, D. & Reed, S. G. Immunological Dominance of Trypanosoma cruzi Tandem Repeat Proteins. *Infection and immunity* 76**,** 3967–74 (2008).

67. Bottino, C. G. *et al.* Chagas disease-specific antigens: characterization of epitopes in CRA/FRA by synthetic peptide mapping and evaluation by ELISA-peptide assay. *BMC infectious diseases* 13**,** 1–10 (2013).

68. Alves Pereira, V. R. *et al.* Evaluation of the immune response to CRA and FRA recombinant antigens of Trypanosoma cruzi in C57BL/6 mice. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36**,** 435–440 (2003).

69. Vasconcelos, R. H. T. *et al.* Immunoglobulin M antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of Trypanosoma cruzi in chronic chagasic patients. *Human Immunology* 72**,** 402–405 (2011).

70. Krieger, M. A. *et al.* Use of Recombinant Antigens for the Accurate Immunodiagnosis of Chagas'Disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46**,** 427–434 (1992).

71. Foti, L. *et al.* Viability study of a multiplex diagnostic platform for Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104**,** 136–141 (2009).

72. Vergara, U., Veloso, C., Gonzalez, A. & Lorca, M. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas disease using synthetic peptides. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36**,** 39–43 (1992).

73. Gomes, Y. M., Lorena, V. M. B. & Luquetti, A. O. Diagnosis of Chagas disease: What has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104**,** 115–121 (2009).

74. Gupta, S. *et al.* Antigenicity and Diagnostic Potential of Vaccine Candidates in Human Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7**,** 1–10 (2013).

75. Jackson, Y. *et al.* Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. *Clinical infectious diseases* 51**,** 69–75 (2010).

76. Buckner, F. S., Wilson, A. J., White, T. C. & Voorhis, W. C. Van. Induction of Resistance to Azole Drugs in Trypanosoma cruzi. *American Society for Microbiology* 42**,** 3245–3250 (1998).

77. Muñoz, M. J., Murcia, L. & Segovia, M. The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. *Expert Reviews* 9**,** 5–7 (2011).

78. Stich, A., Abel, P. M. & Krishna, S. Human African Trypanosomiasis. *British Medical Journal* 325**,** 203–206 (2002).

79. Kennedy, P. G. E. Diagnostic and neuropathogenesis issues in human African trypanosomiasis. *International Journal for Parasitology* 36**,** 505–512 (2006).

80. Kennedy, P. G. E. Human African trypanosomiasis-neurological aspects. *Journal of Neurology* 253**,** 411–416 (2006).

81. World Health Organization. Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness). (2015). at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>

82. *African Animal Trypanosomiasis*. *In Vitro* (2009).

83. Matthews, K. R. Developments in the differentiation of Trypanosoma brucei. *Parasitology Today* 15**,** 76–80 (1999).

84. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites - African Trypanosomiasis (also known as Sleeping Sickness). (2015).

85. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites - African Trypanosomiasis (also known as Sleeping Sickness). (2012). at <http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/gen_info/index.html>

86. Brun, R., Blum, J., Chappuis, F. & Burri, C. Human African trypanosomiasis. *The Lancet* 375**,** 148–159 (2010).

87. Lugli, E. B., Pouliot, M., Portela, M. del P. M., Loomis, M. R. & Raper, J. Characterization of primate trypanosome lytic factors. *Molecular and Biochemical Parasitology* 138**,** 9–20 (2004).

88. Njiru, Z. K., Ndung'u, K., Matete, G., Ndungu, J. M. & Gibson, W. C. Detection of Trypanosoma brucei rhodesiense in animals from sleeping sickness foci in East Africa using the serum associated. *Acta Tropica* 90**,** 249–254 (2004).

89. Donelson, J. E., Hill, K. L. & El-Sayed, N. M. Multiple mechanisms of immune evasion by African trypanosomes. *Molecular and biochemical parasitology* 91**,** 51–66 (1998).

90. Baral, T. N. Immunobiology of African trypanosomes: Need of alternative interventions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010**,** (2010).

91. Namangala, B., De Baetselier, P. & Beschin, A. Both type-I and type-II responses contribute to murine trypanotolerance. *Journal of Veterinary Medicine* 71**,** 313–318 (2009).

92. Sternberg, J. M. & Mabbott, N. A. Nitric oxide-mediated suppression of T cell responses during Trypanosoma brucei infection: soluble trypanosome products and interferon-gamma are synergistic inducers of nitric oxide synthase. *European Journal of Immunology* 26**,** 539–543 (1996).

93. Kaushil, R. S., Uzonna, J. E., Zhang, Y., Gordon, J. R. & Tabel, H. Innate resistance to experimental African trypanosomiasis: differences in cytokine (TNF-α, IL-6, IL-10 and IL- 12) production by bone marrow-derived macrophages from resistant and susceptible mice. *Cytokine* 12**,** 1024–1034 (2000).

94. Shi, M., Wei, G., Pan, W. & Tabel, H. Trypanosoma congolense infections: antibody-mediated phagocytosis by Kupffer cells. *Journal of Leukocyte Biology* 76**,** 399–405 (2004).

95. Hudson, K. M., Byner, C., Freeman, J. & Terry, R. J. Immunodepression, high IgM levels and evasion of the immune response in murine trypanosomiasis. *Nature* 264**,** 256–258 (1976).

96. Hudson, K. M. & Terry, R. J. Immunodepression and the course of infection of a chronic Trypanosoma brucei infection in mice. *Parasite Immunology* 1**,** 317–326 (1979).

97. Taylor, K. A. Immune responses of cattle to African trypanosomes: protective or pathogenic ? *International Journal for Parasitology* 28**,** 219–240 (1998).

98. Darji, A. *et al.* Mechanisms underlying trypanosome-elicited immunosuppression. *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale* 72**,** 27–38 (1992).

99. Sileghem, M., Darji, A., Hamers, R., Van De Winkel, M. & De Baetselier, P. Dual role of macrophages in the suppression of interleukin 2 production and interleukin 2 receptor expression in trypanosome-infected mice. *European Journal of Immunology* 19**,** 829–835 (1989).

100. Kennedy, P. G. E. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *Journal Clinical Investigation* 113**,** 496–504 (2004).

101. Nantulya, V. M. Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 9**,** 357–367 (1990).

102. Barrett, M. P. *et al.* The trypanosomiases. *The Lancet* 662**,** 1469–1480 (2003).

103. Sullivan, L., Wall, S. J., Carrington, M. & Fergurson, M. A. J. Proteomic Selection of Immunodiagnostic Antigens for Human African Trypanosomiasis and Generation of a Prototype Lateral Flow Immunodiagnostic Device. *PLoS Neglected Tropical Diseases* (2013).

104. Ziegelbauer, K. & Overath, P. Identification of invariant surface glycoproteins in the bloodstream stage of Trypanosoma brucei. *Journal of Biological Chemistry* 267**,** 10791–10796 (1992).

105. De Greef, C., Imberechts, H., Matthyssens, G., Van Meirvenne, N. & Hamers, R. A gene expressed only in serum-resistant variants of Trypanosoma brucei rhodesiense. *Molecular and biochemical parasitology* 36**,** 169–176 (1989).

106. Welburn, S. *et al.* Identification of human-infective trypanosomes in animal reservoir of sleeping sickness in Uganda by means of serum-resistance-associated (SRA) gene. *The Lancet* 358**,** 2017–2019 (2001).

107. Giorgio, S., Santos, M. R. M., Straus, A. H., Takahashi, H. K. & Barbiéri, C. L. Effect of glycosphingolipids purified from Leishmania (Leishmania) amazonensis amastigotes on human peripheral lymphocytes. *American Society for Microbiology* 10**,** 469–472 (2003).

108. Carvalho, a. K. *et al.* Leishmania (V.) braziliensis and L. (L.) amazonensis promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. *Parasite Immunology* 34**,** 395–403 (2012).

109. Jennings, Y. L. *et al.* Phenotypic characterization of Leishmania spp. causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, Leishmania (Viannia) guyanensis × Leishmania (Viannia) shawi shawi. *Parasite* 21**,** 39 (2014).

110. Santos-Gomes, G. M. & Abranches, P. Comparative study of infectivity causes by promastigotes of Leishmania infantum MON-1, L.infantum MON-24 and L.donovani MON-18. *Folia Parasitologica* 43**,** 7–12 (1996).

111. Passero, L. F. D. *et al.* Proteins of Leishmania (Viannia) shawi confer protection associated with Th1 immune response and memory generation. *Parasites & Vectors* 5**,** 64 (2012).

112. Camargo, E. P. Growth and differention in Trypanosoma cruzi. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 4**,** 93–100 (1964).

113. Martinez, I. Caracterização de duas cepas de Trypanosoma cruzi chagas, 1909 (Kinetoplastidae) isoladas de exemplares de Triatoma rubrovaria (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae) coletadas em ambiente silvestre. (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, 2004).

114. Zingales, B. *et al.* A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104**,** 1051–1054 (2009).

115. Atouguia, J. L. M. S. New approaches to the chemotherapy of human African Trypanosomiasis. The use of tropical formulation in the mouse model. (Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, 1998).

116. De Sousa, K. P., Atouguia, J. & Silva, M. S. Partial Biochemical Characterization of a Metalloproteinase from the Bloodstream Forms of Trypanosoma brucei brucei Parasites. *Protein Journal* 29**,** 283–289 (2010).

117. Lanham, S. M. & Godfrey, D. G. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Experimental Parasitology* 28**,** 521–534 (1970).

118. Stills, H. F. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *Institute of Laboratory Animal Resources Journal* 46**,** 280–293 (2005).

119. Stevens, J. R., Noyes, H. A., Dover, G. A. & Gibson, W. C. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, Trypanosoma brucei and T. cruzi. *Parasitology* 118**,** 107–116 (1999).

120. El-Sayed, N. M. *et al.* Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. *Science* 309**,** 404–409 (2005).

121. Stevens, J. R., Noyes, H. A., Schofield, C. J. & Gibson, W. The molecular evolution of trypanosomatidae. *Advances in Parasitology* 48**,** 1–53 (2001).

122. Guimarães, M. C., Celeste, B. J., de Castilho, E. A., Mineo, J. R. & Diniz, J. M. Immunoenzymatic assy (ELISA) in mucocutaneous leishmaniasis, kala-azar, and Chagas' disease: an epimastigote Trypanosoma cruzi antigen able to distinguish between anti-Trypanosoma and anti-Leishmania antibodies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30**,** 942–947 (1981).

123. Araujo, F. G. Analysis of Trypanosoma cruzi antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids. *Infection and Immunity* 53**,** 179–185 (1986).

124. Schattschneider, W., Lopes, E. R., De Alencar, J. E., Bienzle, U. & Feldmeier, H. A comparative study of four serological methods for diagnosis of acute and chronic Chagas' disease in Brazilian patients. *Tropical and Geographical Medicine* 44**,** 210–218 (1992).

125. Donelson, J. E. Antigenic variation and the African trypanosome genome. *Acta Tropica* 85**,** 391–404 (2003).

126. Aisa, M. J. *et al.* Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58**,** 154–159 (1998).

127. Mary, C., Lamouroux, D., Dunan, S. & Quilici, M. Western blot analysis of antibodies to Leishmania infantum antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47**,** 764–771 (1992).

128. Pineda, H. P. A. Immunoidentification of trypanosoma cruzi antigens using Sera from chronically infected patients. (Universitätsmedizin Berlin, 2015).

129. Silva, M. S. Vacinas de DNA: Um Modelo Experimental de Imunização Contra a Tripanosomose Africana. (Instituto Superior Técnico, 2006).

Capítulo 7 – Anexos

Meio Schneider's Drosophila

Scheneider's insect medium (Sigma-Aldrich, Alemanha) suplementado com:

10% de FBS inativado (v/v) (Sigma-Aldrich)

0,5% de penicilina/streptomicina (Sigma-Aldrich) (combinação de 10.000 U/mL de penicilina com 10.000 µg/mL de streptomicina)

Meio LIT

68 mM de NaCl

5 mM de KCl_2

49mM de Na_2HPO_4

11 mM de $C_6H_{12}O_6$

0,5% de triptose (Sigma-Aldrich),

0,3% de caldo LB Broth (Sigma-Aldrich)

0,0125% de Haemin (Sigma-Aldrich).

Ajuste de pH para 7,2, autoclavar

Suplementado com 10% de FBS (v/v) e 0,5% de penicilina/streptomicina

Tampão de Lise com cocktail de inibidores de proteases

120mM de NaCl

50mM Tris-HCl

0,5% Nonidet ® P 40 (Fluka Biochemika)

1 Pastilha cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack (Roche) (por cada 5mL para uma solução stock 2x concentrada)

Tampão Bicarbonato 0,1 M pH 8,5

0,1 M de $NaHCO_3$

Esterilizar por filtração e conservar a 4^{o} C.

PBS 10x (*Phosphate Buffer Saline*)

2,7 mM de KCl

1,37 M de NaCl

17,6 mM de KH_2PO_4

101,4 mM de Na_2HPO_4

Água destilada q.b. 1L; pH 7,4.

PBS 1x

10% PBS 10x

Água destilada q.b. 1L; pH 7,4.

Tampão Citrato pH 5,0

24,3 mL de $C_6H_8O_7$ 0,1 M

25,7 mL de NaH_2PO_4 0,1 M

Água destilada q.b. 100 mL

Tampão de Amostra

3,55 mL de Água destilada

1,25 mL de 0,5M Tris-HCl a pH 6,8

2,5 mL de $C_3H_8O_3$

2 mL de SDS 10% (m/v)

200 µL de azul de bromofenol 0,5% (m/v)

50 µL de C_2H_6OS

Tampão de Corrida

250M de Tris

1,92M de Glicina

1% (m/v) de SDS

Tampão de Transferência

0,192M de Glicina

0,025M de Tris

20% (m/v) de CH_4O

Água destilada q.b 1L