



AVALIAÇÃO DA IMUNOREATIVIDADE
CRUZADA ENTRE DIFERENTES FORMAS
PARASITÁRIAS DE *Trypanosoma cruzi* e
Trypanosoma rangeli

Florianópolis, fevereiro de 2004

FABIANA PACHECO GIRARDI

**AVALIAÇÃO DA IMUNOREATIVIDADE
CRUZADA ENTRE DIFERENTES FORMAS
PARASITÁRIAS DE *Trypanosoma cruzi* e
*Trypanosoma rangeli***

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard

Co-Orientador: Prof. Dr. Mário Steindel

Florianópolis

2004

À DEUS

" Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, se não tivesse amor, sou como bronze que soa, ou como um sino que tine. E ainda que eu tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e tivesse toda a fé, até o ponto de transportar montes, se não tivesse amor, nada seria." (São Paulo)

AOS MEUS PAIS

" A vocês que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado.

A vocês, que me iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação, para que eu trilhasse sem medo e cheia de esperança, não bastaria um obrigado.

A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus, não bastaria um muitíssimo obrigado.

A vocês, meus pais não bastaria dizer que não tenho palavras para agradecer tudo isso, mas é o que acontece agora, quando procuro sofregamente uma forma verbal de exprimir uma emoção que palavras dificilmente traduziriam." Amo vocês.

AO MEU IRMÃO

Por todo carinho, amizade e incentivo

" De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estamos começando, a certeza de que é preciso continuar, a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo, fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro.....

Fica o desejo de boa sorte.....

Fica a vontade de que lutes e venças." (Fernando Sabino)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard pela oportunidade, confiança, paciência, amizade e ensinamentos. Ed, você foi muito mais que um orientador, foi um grande amigo, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Mário Steindel pela co-orientação, ensinamentos e também pelas cobranças, com certeza tudo o que aprendi nestes dois anos de convivência me tornaram uma profissional e um ser humano melhor.

À minha amiga Priscilla pela amizade sincera, companherismo, carinho, incentivo e cumplicidade. Pri, de todas as coisas boas que aconteceram no decorrer do mestrado, ter te conhecido e termos nos tornado amigas foi uma das melhores. Quantas coisas vivemos juntas, né? Nossa amizade é para sempre, viu? Obrigada por tudo.

À minha amiga Aline pelo simples fato dela existir. Nê, obrigada por tudo, pela sua amizade, carinho e apoio. Você é uma pessoa maravilhosa. Te Adoro.

Ao meu amigo Leonardo pela amizade, carinho, paciência, por ouvir meus desabafos e por toda a ajuda, se não fosse você sangrar meus camundongos o que seria de mim? Léo, você é muito especial e eu fico muito feliz em ter a sua amizade. Pode contar comigo para sempre, tá?

À minha amiguinha e pupila do coração Milene por toda a ajuda, carinho, amizade, apoio e incentivo. Quantas vezes nos desesperamos juntas

quando os tripos lisavam? Mi, adorei ter te conhecido e ainda mais ter me tornado sua amiga.

À minha amiga Bibiana por todas as vezes que me aconselhou e me mostrou o lado prático e racional das coisas, e também por sua amizade, apoio e carinho.

À minha amiga Danielle por todo o apoio, ajuda e preocupação. Você é muito especial para mim.

À amiga Ane por toda a ajuda e ensinamentos. Muito obrigada.

À minha amiga Gabriela pela amizade e apoio durante todos esses anos de convivência.

À todos os amigos da Proto Letícia, Juliana, Daniela, Janaína, Mônica, Rúbia, Cris, Rodrigo, Juliano, Graci, João, Cíntia, Vivi, Roberto, Débora, Glauber pela amizade e carinho. Adoro todos vocês.

À todos os amigos da Virologia e Imunologia Lú, Jú, Márcia, Javier, Ale, Dani, foi muito bom ter convivido com todos vocês.

Ao Marcelo por todos os anos que passamos juntos e com os quais eu aprendi muito. Apesar de não estarmos mais juntos você sempre será muito especial para mim.

Ao Giulliano por me mostrar que sempre vale a pena buscar o que se deseja e que nunca devemos desistir dos nossos sonhos. Te Adoro.

À todos os professores do departamento em especial ao Prof. Dr. Carlos Zanetti por toda a ajuda, pelos conselhos e amizade. Você é uma pessoa maravilhosa!

Ao centro de pesquisas René Rachou – Fiocruz - MG pelo fornecimento dos soros com os quais foi possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| Lista de Figuras | 12 |
| Lista de Tabelas | 14 |
| Lista de Abreviaturas e Siglas | 15 |
| Resumo | 17 |
| Abstract | 18 |
| 1.0 Introdução | 19 |
| 1.1 Os Parasitas | 19 |
| 1.2 Epidemiologia | 26 |
| 1.3 Patogênese | 29 |
| 1.4 Diagnóstico | 29 |
| 2.0 Objetivos | 34 |
| 2.1 Objetivo Geral | 34 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 34 |
| 3.0 Materiais e Métodos | 35 |
| 3.1 Cepas de <i>T. rangeli</i> | 35 |
| 3.1.2 Cepas de <i>T. cruzi</i> | 35 |
| 3.2 Amostras de Soros | 35 |
| 3.3 Antígenos | 36 |
| 3.3.1 Formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> | 36 |
| 3.3.2 Formas tripomastigotas de cultura de <i>T. cruzi</i> | 37 |
| 3.3.3 Formas tripomastigotas de cultura de <i>T. rangeli</i> | 39 |
| 3.4 Preparação dos antígenos | 39 |
| 3.5 Reação de Imunofluorescência Indireta | 40 |
| 3.6 Análise Estatística | 41 |
| 4.0 Resultados e Discussão | 42 |
| 4.1 Fixação dos antígenos | 42 |
| 4.2 Tripomastigotas de cultura de <i>T. rangeli</i> | 45 |
| 4.3 Imunofluorescência Indireta (IFI) | 47 |
| 4.3.1 Soros de pacientes com a forma Cardíaca x Epimastigotas | 47 |
| 4.3.2 Soros de pacientes com a forma Indet. x Epimastigotas | 50 |
| 4.3.3 Soros de pacientes com a forma Cardíaca x Tripomastigotas | 53 |

| | | |
|--------------|---|----|
| 4.3.4 | Soros de pacientes com a forma Indet. x Tripomastigotas | 55 |
| 5.0 | Conclusões | 69 |
| 6.0 | Perspectivas | 71 |
| 7.0 | Referências Bibliográficas | 72 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Formas tripomastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* em sangue de camundongo. **19**
- Figura 2:** Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição da distribuição da doença de Chagas humana e os registros de ocorrência comprovada de *T. rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres. **28**
- Figura 3:** Resultado da média dos títulos de anticorpos dos 26 soros de pacientes chagásicos crônicos apresentando a forma cardíaca da doença frente às formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepas Y e CL) e *T. rangeli* (cepas Choachi e SC-58) em ensaios de imunofluorescência indireta. **48**
- Figura 4:** Distribuição da fluorescência em formas epimastigotas de *T. cruzi* (A e C) e *T. rangeli* (B) incubadas com soros de pacientes chagásicos crônicos com a forma cardíaca da doença, em ensaios de imunofluorescência indireta, na diluição de 1/40. **49**
- Figura 5:** Resultado da média dos títulos de anticorpos dos 13 soros de pacientes chagásicos crônicos apresentando a forma indeterminada da doença frente às formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepas Y e CL) e *T. rangeli* (cepas Choachi e SC-58) em ensaios de imunofluorescência indireta. **51**
- Figura 6:** Distribuição da fluorescência em formas epimastigotas de *T. cruzi* (A) e *T. rangeli* (B) incubadas com soros de pacientes chagásicos crônicos com a forma indeterminada da doença, em ensaios de imunofluorescência indireta, na diluição de 1/40. **52**
- Figura 7:** Resultado da média dos títulos de anticorpos dos 26 soros de pacientes chagásicos crônicos apresentando a forma cardíaca da doença frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepas Y e CL) e *T. rangeli* (cepas Choachi e SC-58) em ensaios de imunofluorescência indireta. **53**

Figura 8: Distribuição da fluorescência em formas tripomastigotas de *T. cruzi* (A) e *T. rangeli* (B) incubadas com soros de pacientes chagásicos crônicos com a forma cardíaca da doença, em ensaios de imunofluorescência indireta, na diluição de 1/40.

54

Figura 9: Resultado da média dos títulos de anticorpos dos 13 soros de pacientes chagásicos crônicos apresentando a forma indeterminada da doença frente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepas Y e CL) e *T. rangeli* (cepas Choachi e SC-58) em ensaios de imunofluorescência indireta.

56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado dos títulos e da intensidade de reação, no título de 1/40, dos 26 soros de pacientes chagásicos cardíacos testados contra formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura das cepas Y e CL de *T. cruzi* e SC-58 e Choachi de *T. rangeli*. **57**

Tabela 2: Resultado dos títulos e da intensidade de reação, no título de 1/40, dos 13 soros de pacientes chagásicos com a forma indeterminada da doença testados contra formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura das cepas Y e CL de *T. cruzi* e SC-58 e Choachi de *T. rangeli*. **58**

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

ELISA – *Enzyme Linked Immunossorbent Assay*

HAI – Reação de Hemaglutinação Indireta

IFI – Imunofluorescência Indireta

OMS – Organização Mundial da Saúde

LIT – Meio de Infuso de Fígado e Triptose (*Liver Infusion Tryptose*)

BSA – Soro Albumina Bovina (*Bovine Serum Albumin*)

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

SBF – Soro Bovino Fetal

PBS – Salina tamponada com fosfatos (*Phosphate Buffered Saline*)

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

kDNA – DNA Cinetoplástico

mL – mililitro

μ L – microlitro

°C – Grau Celcius

g – Força Gravitacional

pH – Potencial Hidrogeniônico

v /v – Volume por Volume

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

M - Molaridade

mm - milímetro

UV - Ultra Violeta

CO₂ – Dióxido de Carbono

mM – mili molar

cm² – Centímetro Cúbico

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 agente etiológico da doença de Chagas e o *T. rangeli* Tejera, 1920 são parasitas hemoflagelados pertencentes à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, que infectam animais domésticos, silvestres e seres humanos nas Américas Central e do Sul. A presença simultânea desses parasitas em uma mesma região geográfica possibilita a ocorrência de infecções únicas ou mistas, tanto em hospedeiros invertebrados como em vertebrados. Embora o *T. rangeli* não seja considerado patogênico para seres humanos, a infecção por este parasita induz uma resposta imune humoral com elevados títulos de anticorpos, determinando reações sorológicas cruzadas com o *T. cruzi* e dificultando, desta maneira, o diagnóstico da doença de Chagas, especialmente em sua fase crônica. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou comparativamente esta imunoreatividade cruzada, através da análise por Imunofluorescência Indireta, utilizando amostras de soros de pacientes chagásicos crônicos apresentando as formas cardíaca e indeterminada da doença frente a formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura de ambos os parasitas. Os resultados de reatividade sorológica cruzada obtidos com a utilização de formas epimastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* corroboram os dados da literatura. Entretanto, com a utilização das formas tripomastigotas ocorreu uma redução significativa da reatividade cruzada. Estas diferenças na reatividade podem ser decorrentes da constituição antigênica distinta nestas formas evolutivas do parasita.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, sorologia, imunoreatividade sorológica cruzada.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi Chagas, 1909 the etiological agent of Chagas disease and *T. rangeli* Tejera, 1920 are hemoflagellate parasites belonging to the Order Kinetoplastida, Trypanosomatidae Family, which infect domestic and wild animals, as well as humans, in Central and South America. The simultaneous presence of these parasites in the same geographical areas allows the occurrence of single and/or mixed infections in both vertebrate and invertebrate hosts. Considered as non pathogenic for humans, the *T. rangeli* infection induces a humoral immune response with high antibody levels which cross-react with *T. cruzi*, turning difficult the the specific diagnosis of the Chagas disease, especially in the chronic phase. The present study comparatively evaluated this serological cross reactivity through indirect immunofluorescence using serum from chronic chagasic patients with cardiac involvement of presenting no clinical symptoms (indeterminate) and both cultured epimastigote and trypomastigote forms of both parasites. Our results using epimastigote forms of both parasites as antigens corroborated the cross-reactivity previously reported in the literature. Through the use of culture trypomastigotes as antigens a remarkable reduction of the serological cross-reactivity was observed, probably due the distinct antigenic composition of the parasite forms.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, serology, serological cross-reactivity.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Os Parasitas

Trypanosoma cruzi Chagas, 1909 (agente etiológico da doença de Chagas) e *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 são protozoários hemoflagelados pertencentes à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, que infectam animais domésticos, silvestres e seres humanos nas Américas Central e do Sul (Figura 1). Por apresentarem uma distribuição geográfica sobreposta possibilitam a ocorrência de infecções mistas em hospedeiros vertebrados e invertebrados. Além disso, também compartilham um grande número de reservatórios e vetores (De LEON, 1949, 1952; HOARE, 1972; D' ALESSANDRO, 1976; D' ALESSANDRO & SARAVIA, 1992, 1998; MILES et al., 1983; CUBA CUBA, 1998; GRISARD et al., 1999).

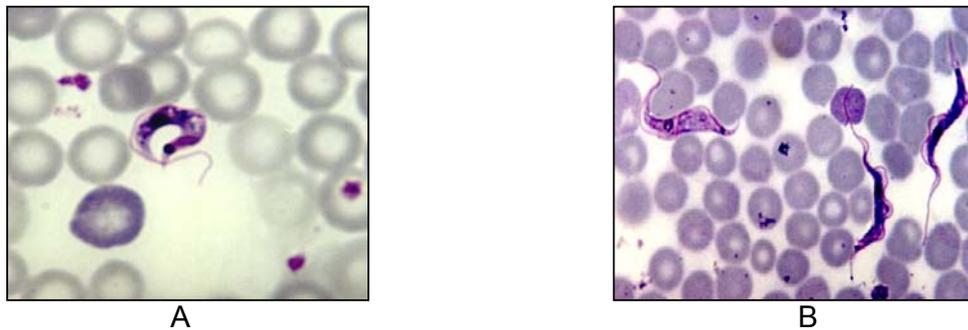


Figura 1. A: Forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* em sangue de camundongo, B: Forma tripomastigota de *Trypanosoma rangeli* em sangue de camundongo.

Aproximadamente 80% das infecções humanas e de outros vertebrados, ocasionadas pelo *T. cruzi*, ocorrem por transmissão vetorial, produzida pelo contato da pele ou mucosas com fezes ou urina de insetos hematófagos da Ordem Hemiptera, Família Reduviidae e Subfamília Triatominae. As espécies de vetores mais importantes são *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (HOARE, 1972; SILVEIRA, 1994; YVES et al., 2002).

Além da transmissão vetorial, a infecção pode se estabelecer por via transfusional, responsável por 5 – 20% dos casos, e pela via congênita, que pode ocorrer em 2 – 10% das mulheres grávidas infectadas, estando na fase aguda ou crônica da doença. Outras formas excepcionais de transmissão são a acidental em laboratórios e hospitais, por transplante de órgãos, via oral (ingestão de alimentos ou leite contaminados) e a transmissão sexual (DIAS, 1989; BITTENCOURT, 2000).

O ciclo biológico do *T. cruzi* é bastante complexo incluindo 3 formas evolutivas distintas e requerendo a participação de um hospedeiro invertebrado (triatomíneo) e de um vertebrado (mamífero) (FERNANDES et al., 1994).

No hospedeiro invertebrado, o ciclo tem início quando formas tripomastigotas, presentes no sangue de animais infectados, são ingeridas pelo inseto vetor durante o repasto sangüíneo. Ao chegarem no estômago, essas formas se transformam gradualmente em formas arredondadas, denominadas epimastigotas, que migram para o intestino, onde se multiplicam e posteriormente atingem o reto transformando-se em tripomastigotas metacíclicos (BITTENCOURT, 2000).

Estes tripomastigotas metacíclicos, que são eliminados juntamente com as fezes e a urina do vetor, durante ou logo após o repasto sangüíneo, penetram pelo local da picada e interagem com células do sistema fagocítico mononuclear da pele ou mucosas do hospedeiro (BITTENCOURT, 2000).

Uma vez no interior da célula hospedeira, os tripomastigotas se diferenciam em formas amastigotas, as quais se evadem do vacúolo endocítico e se multiplicam por sucessivas divisões binárias no citoplasma celular. Após um período de 3 a 4 dias inicia-se um processo de transformação das formas amastigotas em tripomastigotas, sendo então liberadas no meio extracelular, após o rompimento da célula parasitada. Essas formas têm capacidade de infectar outras células ou de atingir a corrente circulatória e distribuir-se por todo o organismo (LARANJA et al., 1956; STEINDEL, 1993; YVES et al., 2002).

Ao contrário do *T. cruzi*, o *T. rangeli* não é considerado patogênico para o hospedeiro mamífero (SOUTO et al., 1999), podendo ser detectado em aproximadamente 20 gêneros de animais distribuídos em 5 diferentes ordens (DEANE, 1958 a, 1958 b; D' ALESSANDRO, 1976; MILES et al., 1983; STEINDEL et al., 1991; D' ALESSANDRO & SARAVIA, 1992; SULLIVAN et al., 1993; GRISARD et al., 1999).

De Leon (1952) detectou pela primeira vez o *T. rangeli* em amostras de sangue humano enquanto estudava a doença de Chagas na Guatemala. Desde então, mais de 2.600 casos de infecção humana já foram descritos (D' ALESSANDRO, 1976; D' ALESSANDRO & SARAVIA, 1992; STEINDEL, 1993; GRISARD et al., 1999).

A transmissão ocasionada pela introdução de metatripomastigotas contidas na saliva do inseto vetor durante o repasto sangüíneo é o principal e mais

importante meio de infecção do *T. rangeli* em hospedeiros vertebrados (D' ALESSANDRO, 1976). Outra possível e controversa via de transmissão relatada é a chamada via posterior de transmissão, que ocorre através das fezes do vetor. Coutinho & Nussenzweig (1952) e Grewal (1956) relataram a infecção de animais de laboratório pela inoculação de fezes de triatomíneos infectados pelo *T. rangeli*. Contrariamente, outros autores (TOBIE, 1964; CUBA CUBA et al., 1972; HECKER et al., 1990; STEINDEL et al., 1991) em nenhuma das inúmeras tentativas foram capazes de estabelecer a infecção em camundongos a partir da inoculação de flagelados presentes nas fezes de triatomíneos infectados pelo *T. rangeli*.

Além da transmissão primariamente anterior, o ciclo biológico do *T. rangeli* apresenta outras particularidades em relação ao do *T. cruzi*. Os parasitas, ingeridos durante o repasto sangüíneo, após sofrerem intensa multiplicação no intestino do inseto vetor, podem atingir o reto e serem excretados com as fezes, ou penetrar na hemolinfa e invadir as glândulas salivares, onde se reproduzem e se diferenciam em formas metatrimastigotas infectivas para os hospedeiros vertebrados. Essa capacidade de invasão da hemolinfa e glândulas salivares constitui a principal característica deste parasita (D' ALESSANDRO, 1976; STEINDEL et al., 1991; D' ALESSANDRO & SARAVIA, 1992).

Devido a esta intensa multiplicação dos flagelados na hemolinfa e do elevado parasitismo dos hemócitos, o *T. rangeli* acaba por exercer uma ação patogênica, caracterizada pela destruição destas células e pela dificuldade de muda e desenvolvimento das ninfas (TOBIE, 1964; CUBA CUBA et al., 1972; D' ALESSANDRO, 1976; HECKER et al., 1990; GUARNERI, 1996).

As espécies de triatomíneos do gênero *Rhodnius* são os principais vetores naturais e experimentais do *T. rangeli*. Entretanto outras espécies como

Triatoma dimidiata, *T. patagonica*, *T. protracta* e *T. infestans* também são capazes de transmitir o parasita em condições experimentais (D' ALESSANDRO, 1976; TOVAR, URDANETA-MORALES & TEJERO, 1989; STEINDEL et al., 1991; D' ALESSANDRO & SARAIVIA, 1992; STEINDEL, 1993; COURA et al., 1996).

No hospedeiro vertebrado, o ciclo do *T. rangeli* permanece ainda sem ter sido totalmente elucidado. Durante o repasto sangüíneo são depositados, no tecido do hospedeiro, um grande número de metatripomastigotas e formas arredondadas que sofrem um crescimento contínuo até os tripomastigotas sangüíneos atingirem o tamanho definitivo. O nível de parasitemia é geralmente baixo e de curta duração, aproximadamente 2 a 3 semanas (SOUSA & JOHNSON, 1971; STEINDEL, 1993).

A fase reprodutiva do *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado, apesar de ocorrer, é bastante controversa. Poucas observações de formas tripomastigotas sangüíneas que parecem estar em divisão foram realizadas em seres humanos e roedores (STEINDEL, 1993). No entanto, segundo D' Alessandro (1976), estas observações geralmente são feitas em indivíduos recentemente infectados, podendo estas formas serem provenientes das glândulas salivares do inseto e não uma consequência da multiplicação do parasita (D' ALESSANDRO, 1976).

Além disso, várias tentativas de infecção experimental de células *in vitro* pelo *T. rangeli* revelaram uma baixa infectividade e nenhuma evidência de multiplicação intracelular (D' ALESSANDRO & SARAIVIA, 1992; MANGRICH et al., 2001).

A infecção do *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado é caracterizada portanto, pela ausência de patogenicidade, ausência de formas em divisão nos tecidos e no sangue e pela limitada duração da parasitemia (D' ALESSANDRO, 1976).

Como consequência da ausência de manifestações clínicas na infecção por *T. rangeli* e a falta de procedimentos adequados para o diagnóstico específico, acredita-se numa subestimação do número de casos humanos de infecção pelo *T. rangeli* e, conseqüentemente uma possível superestimação nos casos de infecção pelo *T. cruzi* (SOUSA & JOHNSON, 1971).

Embora o *T. rangeli* seja considerado não patogênico para o hospedeiro mamífero, a infecção por este parasita induz uma resposta imune humoral que resulta em elevados títulos de anticorpos, os quais determinam uma reatividade cruzada com antígenos do *T. cruzi* em testes sorológicos (GUHL & MARINKELLE, 1982). Esta reatividade cruzada é consequência da grande similaridade entre os antígenos de superfície dos dois parasitas. Afchain (1979) e seus colaboradores demonstraram que 60% dos antígenos solúveis do *T. cruzi* são compartilhados com o *T. rangeli* (AFCHAIN et al., 1979).

Devido a esta grande similaridade, o diagnóstico da doença de Chagas em regiões onde o *T. cruzi* e o *T. rangeli* coexistem apresenta-se como um sério problema em função da ocorrência de resultados falso-positivos (GUHL & MARINKELLE, 1982; GUHL et al., 1987; HUDSON et al., 1992; BASSO et al., 1991; ROSS & NOVOA-MONTERO, 1983; SALDAÑA et al., 1995, 1996 a, 1996 b; GRISARD et al., 1999; VARGAS et al., 2000).

Neste contexto, o correto diagnóstico da infecção chagásica e a identificação específica destes dois parasitas é extremamente relevante tanto do ponto de vista social, terapêutico como epidemiológico (GUHL et al., 1987; HUDSON et al., 1992; ROSS & NOVOA-MONTERO, 1983; SALDAÑA et al., 1995; SALDAÑA et al., 1996 a, 1996 b; GRISARD et al., 1999; VARGAS et al., 2000).

A distinção entre *T. cruzi* e *T. rangeli* pode ser feita através de métodos biológicos (desenvolvimento nas glândulas salivares de triatomíneos), morfológicos (morfometria de formas sangüíneas), bioquímicos (lise pelo complemento, aglutinação por lectinas, isoenzimas, esquizodemas, perfil proteico), imunológicos (ELISA, *Western blot* e anticorpos monoclonais) e moleculares como a PCR e *Southern blot* (D' ALESSANDRO, 1976; MIRANDA SANTOS & PEREIRA, 1984; SCHOTTELIUS, 1984; SCHOTTELIUS & MULLER, 1984; ACOSTA et al., 1991; GONÇALVES et al., 1991; STEINDEL et al., 1991; MURTHY et al., 1992; ROSS & NOVOA-MONTERO, 1983; STEINDEL, 1993; SALDAÑA et al., 1993; SALDAÑA et al., 1995; SALDAÑA et al., 1998; VALLEJO et al., 1999).

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos tem proporcionado a identificação e o isolamento de antígenos dos parasitas, proporcionando a caracterização de proteínas específicas com potencial uso em diagnóstico (GRISARD et al., 1999).

Grisard (1999) e colaboradores, utilizaram 4 anticorpos monoclonais de *T. cruzi* e 10 de *T. rangeli* para avaliar, através de imunofluorescência indireta e *Western blot*, a variabilidade antigênica dos dois parasitas. De acordo com os resultados obtidos, nenhum anticorpo monoclonal anti-*T. cruzi* reagiu com nenhuma cepa de *T. rangeli*. Esses resultados mostram que a utilização de anticorpos monoclonais é capaz de diferenciar os dois parasitas (GRISARD et al., 1999).

1.2 Epidemiologia

A doença de Chagas é uma das mais antigas enfermidades que acometem os seres humanos de algumas populações nativas das Américas, tendo tido sua expansão na era pós-colombiana como consequência das profundas alterações demográficas e ecológicas (SILVEIRA, 1994).

A dispersão do *T. cruzi* é bastante ampla no Continente Americano, especialmente da enzootia silvestre (ciclo silvestre do parasita), a qual se estende desde a Carolina do Norte e Maryland nos EUA até as regiões meridionais do Chile e Argentina, incluindo as Guianas e ilhas do Caribe (WOODY, 1955).

No entanto, sua área de distribuição como uma endemia humana é mais restrita, limitando-se basicamente às áreas onde ocorreu a domiciliação de triatomíneos.

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde existem entre 16 e 18 milhões de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* e cerca de 100 milhões expostos ao risco de contrair a enfermidade (SILVA, 2002).

No Brasil, a área endêmica foi delimitada por extensos inquéritos nacionais realizados entre 1975 e 1980. Esta área corresponde a 36% do território nacional, com 3,5 milhões de quilômetros quadrados, que se estende do Maranhão até o Rio Grande do Sul atingindo mais de 2.450 municípios de 19 Estados e envolvendo grande parte das Regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul (Figura 2).

As áreas de maior concentração da doença são aquelas onde se instalou o *Triatoma infestans*, e compreendem os Estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo, norte do Paraná, Goiás e Bahia. Nos últimos anos, estão sendo

detectados focos de transmissão natural na Região Amazônica, particularmente no Pará, no Amapá e no Alto do Rio Negro (SILVEIRA, 1994).

Ao contrário do *T. cruzi*, a distribuição e a freqüência das infecções por *T. rangeli* em hospedeiros vertebrados e triatomíneos são pouco conhecidas. Até a presente data, os relatos de ocorrência do *T. rangeli* apresentam uma distribuição geográfica que se sobrepõe a do *T. cruzi*, estendendo-se do Sul do México até o Sul da América do Sul (Figura 2). Não há relatos da existência do *T. rangeli* no Chile, Argentina, Paraguai e Uruguai (De LEON, 1949, 1952; HOARE, 1972; D' ALESSANDRO, 1976; D' ALESSANDRO & SARAVIA, 1992; CUBA CUBA, 1998; SOUTO et al., 1999).

No Brasil, flagelados semelhantes ao *T. rangeli* foram inicialmente observados, através de suas características morfológicas, nas fezes de ninfas de *Panstrongylus megistus* (STEINDEL, 1993).

O primeiro caso de infecção humana foi detectado em 1996 na região Amazônica (COURA et al., 1996).



Figura 2. Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição da distribuição da doença de Chagas humana até 1992, segundo a OMS (sombreado) e os registros de ocorrência comprovada de *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (●) (Segundo GRISARD et al., 2003).

1.3 Patogênese

A doença de Chagas é uma enfermidade crônica debilitante e incapacitante, responsável, em áreas endêmicas brasileiras, por 9,1% de todas as pensões por invalidez recebidas por pessoas entre 30 e 50 anos (ZICKER, 1985). Na América Latina, o ônus da doença é o quarto em importância entre as enfermidades infecciosas prevalentes na região. Somente as infecções respiratórias agudas, as doenças diarréicas e a AIDS produzem um ônus maior (YVES et al., 2002).

O curso clínico da doença é crônico e se caracteriza por uma fase inicial aguda, com sinais e sintomas quase sempre inespecíficos, quando presentes, e evolui para uma fase crônica assintomática (80%), também chamada de indeterminada. O restante, cerca de 10 a 20% dos casos não tratados, evolui para a fase crônica, com comprometimento cardíaco (cardiopatia chagásica), problemas digestivos severos (megaesôfago e megacólon) ou mesmo formas mistas destas duas (YVES et al., 2002).

1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* deve considerar a epidemiologia, a clínica e o diagnóstico laboratorial. A importância do diagnóstico laboratorial é notória, pois apenas 5% dos indivíduos infectados apresentam os sinais e sintomas característicos da doença de Chagas (FERREIRA et al., 1991).

Atualmente, o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas é realizado através de métodos parasitológicos diretos e/ou indiretos, e através de métodos

sorológicos, cada um apresentando valores de especificidade e sensibilidade distintos em função de fatores metodológicos ou da fase de infecção (aguda ou crônica). Existem ainda inúmeras descrições do uso de técnicas de biologia molecular, como a PCR, no diagnóstico da doença de Chagas (MURTHY et al., 1992; STEINDEL, 1993; SOUTO et al., 1999).

Dentre a gama de metodologias disponíveis, o diagnóstico sorológico é o mais amplamente difundido e utilizado, sendo principalmente utilizados o ELISA (*Enzyme Linked Immunossorbent Assay*), a Hemaglutinação Indireta (HAI), a Aglutinação Direta com 2-mercapto-etanol (AD2ME) e a Imunofluorescência Indireta (IFI) (FERREIRA et al., 1991).

Estes testes sorológicos são amplamente empregados na confirmação ou exclusão de uma suspeita clínica de infecção chagásica, para a seleção de doadores em bancos de sangue, para o acompanhamento de terapêutica antiparasitária, para fins sociais na seleção de trabalhadores e em inquéritos soroepidemiológicos (SILVA, 2002).

Os métodos sorológicos são a melhor alternativa na fase crônica da doença, caracterizada pela presença de elevados títulos de anticorpos específicos e uma baixa, inconstante ou inexistente parasitemia que dificulta a utilização dos métodos parasitológicos (FERREIRA et al., 1991).

Mesmo sendo o método de escolha na maioria dos casos, a sorologia apresenta algumas limitações, inerentes a sua própria natureza. Em casos de imunodeficiências, sejam congênitas ou adquiridas, o sistema imune pode responder de uma forma menos eficaz contra o parasita, originando baixos títulos de anticorpos, o que compromete o correto diagnóstico. Por outro lado, a existência de

reações cruzadas originadas por parasitas antigenicamente similares, como é o caso do *T. rangeli*, pode gerar resultados falsamente positivos.

Considerando estes fatos, a Organização Mundial da Saúde em 1987 preconizou a realização de, pelo menos, duas técnicas com diferentes metodologias, sensibilidade e especificidade, visando assegurar melhor qualidade aos resultados (SILVA, 2002).

No Brasil, o Ministério da Saúde, através de legislação pertinente, recomenda a utilização de pelo menos duas das seguintes técnicas: ELISA, IFI ou HAI, para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1993).

Dentre estes testes, o ELISA apresenta-se como o mais sensível (97,7%) e específico (93,3 a 100%), sendo amplamente utilizado na triagem sorológica em bancos de sangue devido a possibilidade de automação. Silveira et al. (2001) avaliaram o uso de antígenos recombinantes de *T. cruzi* no diagnóstico sorológico. A utilização dos antígenos CRA e FRA em ensaios de ELISA apresentou uma sensibilidade de 98,3% e 100% de especificidade (FERREIRA et al., 1991; SILVEIRA et al., 2001; SILVA, 2002).

O teste HAI – Hemaglutinação Indireta, amplamente utilizado desde 1962, é um teste de fácil execução, prático, de baixo custo e que não necessita de equipamentos adicionais, por isso sua utilização é recomendada para triagem de doadores de sangue, para fins diagnósticos e inquéritos soropidemiológicos. Em geral, possui uma sensibilidade em torno de 95% e especificidade de cerca de 98% (FERREIRA et al., 1991).

O teste de imunofluorescência tem sido muito empregado na rotina laboratorial para a detecção de anticorpos no soro e outros fluidos biológicos, sendo

considerado o teste de referência na sorologia de muitas doenças. Apresenta várias vantagens, pois é sensível, específico, reprodutível e de simples padronização e execução (JAMES, 1990). Para a sua realização antígenos padronizados são fixados em lâminas de vidro apropriadas, o soro do paciente é diluído, colocado sobre o antígeno e incubado para permitir a formação do complexo antígeno-anticorpo. Para revelar a presença dos anticorpos, procede-se uma segunda incubação com anticorpos anti-imunoglobulina G humana conjugados com substâncias chamadas cromógenos (fluoresceína), que quando excitadas por luz ultravioleta, emitem sinais de coloração verde, visíveis ao microscópio de fluorescência. Utilizando-se diluições seriadas do soro é possível determinar o título de anticorpos, que será a máxima diluição onde ainda se observa a fluorescência. Apresenta sensibilidade de 100% e especificidade em torno de 94%, quando comparado a outros testes (JAMES, 1990; FERREIRA et al., 1991; SILVA, 2002).

O teste de imunofluorescência para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*, que utiliza formas epimastigotas como antígeno, tem sido considerado como teste de referência na sorologia da doença de Chagas. No entanto, pode apresentar reações cruzadas com outras infecções, principalmente quando são utilizados antígenos não purificados. As reações mais freqüentes são observadas em pacientes com calazar, leishmaniose tegumentar e infectados com o *T. rangeli*. Como consequência destas reatividades cruzadas resultados falso-positivos podem ocorrer, dificultando o diagnóstico e ocasionando falsa inferência epidemiológica (JAMES, 1990; GRISARD et al., 1999).

Através da Lei nº 7.649/88 e, posteriormente, as Portarias nº 721/89, alterada pela de nº 1.376/93, o Brasil passou a dispor de uma legislação que disciplinou a prática da hemoterapia como um todo, recomendando que o sangue

dos doadores fosse submetido à triagem de anticorpos anti-*T. cruzi*, mediante o uso de, pelo menos, duas técnicas sorológicas (SILVA, 2002).

No Brasil, principalmente em bancos de sangue, é elevado o número de resultados inconclusivos às provas sorológicas para doença de Chagas, ocasionando uma importante repercussão, principalmente econômica, em decorrência do descarte destas bolsas.

Na Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo o descarte alcançou índices de 2,5% em 1991 e 1992, e de 1,6% em 1993. Destes, mais da metade foram descartados devido a resultados inconclusivos para o *T. cruzi* (SILVA, 2002).

Segundo Silva (2002) analisando o comportamento sorológico de 34.887 doações de sangue no Hemocentro Regional de Uberaba, Minas Gerais, no período de janeiro de 1998 a dezembro de 1999, observou que 177 bolsas foram soropositivas e 75 (0.21% do total das doações) apresentaram resultados inconclusivos para infecção por *T. cruzi* sendo conseqüentemente descartadas (SILVA, 2002).

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a reatividade cruzada de soros de pacientes chagásicos contra diferentes formas do *Trypanosoma cruzi* e do *Trypanosoma rangeli* utilizando a técnica de imunofluorescência indireta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar e quantificar a reatividade de soros de pacientes chagásicos crônicos apresentando a forma cardíaca e indeterminada da doença contra formas epimastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi*.
- Comparar e quantificar a reatividade de soros de pacientes chagásicos crônicos apresentando a forma cardíaca e indeterminada da doença contra formas tripomastigotas de cultura de *T. rangeli* e *T. cruzi*.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas de *Trypanosoma rangeli*

Foram utilizadas, no presente estudo, as cepas SC-58, isolada por hemocultura do roedor *Echymys dasythrix*, naturalmente infectado na ilha de Santa Catarina – Estado de Santa Catarina, Brasil (STEINDEL et al., 1991) e a cepa Choachi, isolada das glândulas salivares de *Rhodnius prolixus*, naturalmente infectado, capturado no Estado de Cundinamarca, Colômbia (SCHOTTELIUS, 1984).

3.1.2 Cepas de *Trypanosoma cruzi*

Foram utilizadas as cepas CL, isolada de *Triatoma infestans* em 1963 na localidade de Encruzilhada – Estado do Rio Grande do Sul, Brasil e a cepa Y, isolada em 1978 de um caso humano agudo da doença em São Paulo, Brasil.

3.2 Amostras de soros

Para a avaliação da imunoreatividade cruzada entre as diferentes formas do *T. cruzi* e do *T. rangeli*, foram utilizadas 26 amostras de soros de pacientes chagásicos crônicos apresentando a forma cardíaca e 13 a forma indeterminada da doença. Estes soros foram obtidos das sorotecas do Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP) da Universidade Federal de

Santa Catarina (UFSC) e do Centro de Referência para o Tratamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Estes soros foram previamente testados por IFI pelas instituições de origem utilizando formas epimastigotas como antígeno e os pacientes caracterizados quanto à forma clínica.

Em todos os ensaios foram utilizados, além dos soros teste, soros padrões positivos e negativos previamente testados e caracterizados pelo Laboratório de Protozoologia, considerado Laboratório de Referência para o diagnóstico da doença de Chagas e leishmanioses para o Estado de Santa Catarina.

A utilização dos soros humanos bem como o uso de animais foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Santa Catarina sob o número 155 CEUA.

3.3 Antígenos

Como antígenos para a reação de imunofluorescência indireta foram utilizadas formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura de cada cepa das diferentes espécies de parasita em estudo.

3.3.1 Formas epimastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli*

Formas epimastigotas da cepa Y e CL de *T. cruzi* e da cepa Choachi e SC-58 de *T. rangeli* foram obtidas através de cultivo em meio LIT (CAMARGO, 1964) a 28°C em estufa bacteriológica. As cepas foram mantidas através de repiques semanais em meio suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF).

3.3.2 Formas tripomastigotas de cultura de *T. cruzi*

Formas tripomastigotas da cepa Y e CL de *T. cruzi* foram obtidas do sobrenadante de cultura de células Vero (ATCC-CCL81). As linhagens celulares foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² em meio Dulbeco's Modified Eagle Medium - DMEM pH 7,4, acrescido de 10% de SBF, 2mM de L-glutamina e 100µg/mL de ampicilina sódica. As células foram mantidas através de repiques semanais em estufa umidificada a 5% de CO₂ à 37°C.

Para a infecção celular, os frascos de cultura foram lavados com solução salina tamponada (PBS) estéril pH 7,4 e as monocamadas tratadas com tripsina 0,25% mais EDTA 0,1% por 5 minutos à 37°C. Em seguida, as células foram lavadas em DMEM pH 7,4 suplementado com 10% de SBF, a 250 x g por 5 minutos à temperatura ambiente e novamente adicionadas no mesmo meio. O número de células foi determinado em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 1,0 x10⁶ células/mL. A viabilidade das células foi verificada através de coloração vital (Trypan blue 0,02%) e a suspensão mantida em banho de gelo até ser utilizada.

Quinhentos microlitros da suspensão celular, contendo aproximadamente 500.000 células, foi semeada em frascos de cultura de 25 cm² e cultivadas em estufa umidificada a 5% de CO₂ à 37°C em meio DMEM pH 7,4 mais 10% de SBF.

Após 24 horas, as monocamadas celulares foram lavadas 3 vezes em PBS estéril pH 7,4 para a remoção de células não aderentes e infectadas com aproximadamente 10.000 tripomastigotas sangüíneos da cepa Y. Estas formas foram obtidas através de punção retro-orbital de camundongos Swiss experimentalmente infectados. Após a punção, o sangue foi centrifugado a 500 x g por 10 minutos e mantido por 1 hora em banho-maria à 37°C, sendo então coletado

o sobrenadante contendo os tripomastigotas. Para a infecção com a cepa CL, culturas na fase estacionária de crescimento em meio LIT, foram lavadas 2 vezes em PBS estéril pH 7,4 e incubadas por 30 minutos com soro humano normal à temperatura ambiente. Após a incubação com o soro humano, o qual propicia a lise das formas epimastigotas, a cultura foi novamente centrifugada a 500 x *g* por 10 minutos e suspensa em meio DMEM pH 7,4. Uma nova centrifugação a 500 x *g* por 2 minutos foi realizada e a cultura foi então mantida por 1 hora em banho-maria à 37°C para o posterior recolhimento dos tripomastigotas presentes no sobrenadante.

A exposição das células aos parasitas, tanto da cepa Y como da CL, foi interrompida após 12 horas através de sucessivas lavagens com PBS estéril pH 7,4 à 4°C para a retirada de parasitas não aderidos. Em seguida, foram novamente incubadas em meio DMEM pH 7,4 nas mesmas condições. Após 72 horas, o parasita completa sua multiplicação intracelular e as formas tripomastigotas liberadas no sobrenadante foram coletadas, centrifugadas a 2.000 x *g* por 10 minutos e suspensas em PBS glicosado 0,1% para posterior fixação e utilização na reação de imunofluorescência indireta.

3.3.3 Formas tripomastigotas de cultura de *Trypanosoma rangeli*

Formas tripomastigotas da cepa Choachi e SC-58 de *T. rangeli* foram obtidas através de cultivo em meio LIT (CAMARGO, 1964) e posterior diferenciação em meio DMEM, conforme descrito por Koerich et al. (2002).

Resumidamente, parasitas obtidos na fase exponencial de crescimento em meio LIT, foram lavados 3 vezes em PBS estéril pH 7,4 e tiveram a concentração ajustada para 2×10^6 parasitas/mL em meio DMEM pH 8,0 acrescido de 5% de SBF. Em tubos cônicos de cultura de 15mL ou em garrafas estéreis, os parasitas foram mantidos em estufa bacteriológica à 28°C por um período de 6 a 8 dias.

A partir do sexto dia de cultivo, a taxa de diferenciação foi avaliada diariamente através da contagem randômica de 200 parasitas em esfregaços corados pelo método de Giemsa. As culturas com taxa de diferenciação superiores a 80% foram então lavadas em PBS glicosado 0,1% para posterior fixação e utilização na reação de imunofluorescência indireta.

3.4 Preparação dos antígenos

As formas epimastigotas das cepas Y e CL de *T. cruzi*, Choachi e SC-58 de *T. rangeli*, obtidas na fase exponencial de crescimento em meio LIT, assim como as formas tripomastigotas de cultura foram lavadas 3 vezes em PBS pH 7,4 por centrifugação a $2.000 \times g$ por 10 minutos.

Após a lavagem, os parasitas foram fixados em paraformaldeído 2% em PBS (v/v) por 12 horas à 4°C. Em seguida foram realizadas mais duas lavagens em PBS pH 7,4 a $2.000 \times g$ por 10 minutos e a concentração final ajustada para 1×10^6

parasitas/mL em PBS acrescido de 1% de soro albumina bovina (BSA). Uma vez pronto, 5 μ L de antígeno foram distribuídos por poço em lâminas próprias para imunofluorescência. As lâminas foram secas ao ar e a manutenção da morfologia dos parasitas fixados, avaliada em microscópio óptico. As lâminas foram então embaladas em papel alumínio e conservadas à -20°C até sua utilização.

3.5 Reação de Imunofluorescência Indireta

Os soros incluídos no presente estudo foram diluídos sucessivamente (1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 e 1/1280) em tampão PBS pH 7,4. Os controles positivo e negativo foram utilizados na diluição de 1/40 em PBS pH 7,4.

Após a diluição as amostras e os controles foram distribuídos sobre as lâminas contendo o antígeno fixado, conforme o descrito em 3.4, e incubadas por 30 minutos à 37°C, em câmara úmida. Ao final do tempo de incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes por 10 e 5 minutos respectivamente em tampão PBS pH 7,4, enxaguadas brevemente em água destilada e imediatamente secas ao ar.

O conjugado anti-imunoglobulina G total humana Fluoline H, Biolab, São Paulo, marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi preparado através de uma diluição de 1/200 em tampão PBS pH 7,4. O corante azul de Evans 0,01%, usado para diminuir a coloração de fundo, foi utilizado numa concentração de 1/100 em PBS pH 7,4.

Após a preparação do conjugado, 10 μ L do mesmo foram adicionados sobre as lâminas, e uma nova incubação de 30 minutos à 37°C, em câmara úmida e ao abrigo da luz foi realizada. Ao final da incubação, as lâminas foram novamente

lavadas duas vezes por 10 e 5 minutos em tampão PBS pH 7,4 e enxaguadas brevemente em água destilada.

Após serem secas ao ar as lâminas receberam uma camada de glicerina tamponada (glicerina comercial : tampão carbonato/bicarbonato 0,5 M pH 9,5, 9:1), e foram cobertas com lamínula 24 X 50mm, sendo então observadas em microscópio de fluorescência Olympus – Bx40 – FL utilizando-se a objetiva de 20X e 40X.

A positividade da reação é determinada pela observação de uma coloração verde-fluorescente, produzida pela ativação da fluoresceína sob a luz UV, presente apenas nos parasitas incubados com soros positivos. O título de cada amostra foi determinado pela diluição máxima do soro teste onde pôde ser detectada fluorescência. A intensidade de fluorescência em cada título positivo foi ainda avaliada como: +++ forte, ++ média, + fraca e – negativa no título de 1/40.

Todos os experimentos foram realizados em duplicata de forma duplo cega e avaliados por, pelo menos, dois observadores independentes.

3.6 Análise Estatística

Os títulos obtidos para os soros de pacientes chagásicos crônicos, apresentando as formas cardíaca e indeterminada da doença testados contra as formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* e *T. rangeli* foram estatisticamente analisados pelo teste de ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Dunn's, sendo consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fixação dos antígenos

Durante o processo de fixação dos antígenos para a reação de imunofluorescência indireta, observou-se um comportamento distinto entre as formas epimastigotas e tripomastigotas. O protocolo de fixação, inicialmente proposto e testado para as formas epimastigotas, não pôde ser utilizado para as formas tripomastigotas. Após a adição do paraformaldeído 2% e conseqüente centrifugação uma intensa lise celular era observada, o que nos levou a padronizar um novo protocolo de fixação.

Foram testadas alterações em relação ao número de centrifugações com PBS, a utilização de PBS glicosado em diferentes concentrações, alterações na força centrífuga, concentração de paraformaldeído e a utilização de formaldeído em diferentes concentrações. Após inúmeros testes, o protocolo padronizado consiste em lavar as formas tripomastigotas de cultura 2 vezes por centrifugação em PBS glicosado 0,1% a 500 x *g* por 10 minutos à 4°C.

Após a centrifugação, os parasitas foram novamente adicionados de PBS glicosado 0,1% e fixados em formaldeído 7,5% por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida foi realizada mais uma centrifugação em PBS glicosado 0,1% a 500 x *g* por 10 minutos à 4°C e a concentração final ajustada para 1x10⁶ parasitas/mL em PBS acrescido de 1% de BSA.

A superfície celular dos tripanossomatídeos é bastante variável, na dependência da espécie e do ciclo evolutivo. No caso do *T. cruzi* todas as formas evolutivas apresentam um discreto glicocálice, que é constituído por proteínas

periféricas e por proteínas integrais que se projetam para o lado externo da célula. Esse conjunto de macromoléculas, que é variável entre as diferentes formas evolutivas do parasita, confere um aspecto morfológico à sua superfície. Nas formas epimastigotas a superfície é bastante lisa, já as formas amastigotas e tripomastigotas apresentam uma superfície rugosa, possivelmente indicando a presença de um número maior de complexos macromoleculares expostos na superfície celular (HOARE et al., 1996; De SOUZA, 1995; BITTENCOURT, 2000).

Levando-se em consideração a presença de carboidratos expostos na superfície celular e a existência de proteínas isoladas de plantas e animais que reconhecem especificamente carboidratos, as lectinas têm sido utilizadas para o estudo comparativo do glicocálice das diferentes formas do ciclo de vida do *T. cruzi* (De SOUZA, 1995). O uso de diferentes lectinas têm mostrado a existência de diferenças significativas entre as várias formas evolutivas do parasita. Como exemplo, pode-se citar o emprego da lectina do gérmen do trigo (WGA), que reconhece resíduos de N-acetil-D-glicosamina e ácido siálico. Essa lectina é capaz de aglutinar intensamente as formas epimastigotas, mesmo em baixas concentrações, requerendo maiores concentrações para aglutinar as outras formas (De SOUZA, 1995; BITTENCOURT, 2000).

Katzin et al. (1980) demonstraram através de aglutinação e imunofluorescência a presença de receptores para as lectinas ConA, SBA e WGA em formas epimastigotas e apenas receptores para ConA em formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*. Os mesmos autores em 1983, utilizando 3 lectinas marcadas radioativamente no estudo de glicoproteínas de superfície de formas tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, observaram

mudanças no perfil destas glicoproteínas de acordo com o estágio evolutivo (KATZIN & COLLI, 1983).

Diferenças qualitativas e quantitativas em glicoproteínas de superfície de formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas de 3 cepas (Y, CL e MR) de *T. cruzi*, foram observadas através de testes de imunofluorescência com as lectinas RCA, ConA, PNA e WGA (ARAÚJO et al., 1980).

Um outro aspecto importante da superfície celular é a sua carga, que é conferida pela presença de grupamentos aniônicos e catiônicos expostos. O grau de negatividade da superfície de uma célula interfere significativamente na sua capacidade de aderir ou não a outras células ou substratos biológicos, interferindo, portanto, no comportamento celular (De SOUZA, 1995).

Estudos realizados mostram que a forma tripomastigota do *T. cruzi* apresenta a superfície mais negativa, enquanto a forma epimastigota é a menos negativa. Resíduos de ácido siálico associados a glicoproteínas e glicolípídeos são os principais responsáveis pelo grau de negatividade da superfície celular (De SOUZA, 1995).

Diferenças significativas entre as várias formas evolutivas também são encontradas no que se refere a membrana citoplasmática. A membrana que reveste as formas epimastigotas é muito mais rica em proteínas integrais, e conseqüentemente mais rígida do que a que reveste a forma amastigota e tripomastigota. Sendo assim, a membrana plasmática das formas amastigota e tripomastigota apresenta um grau maior de fluidez (HOARE et al., 1996).

As formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* não são tão bem estudadas mas, assim como o *T. cruzi*, também apresentaram um comportamento distinto durante o processo de fixação. Ao contrário do *T. cruzi*, que é aglutinado por

lectinas que reagem com um amplo espectro de resíduos de açúcares, o *T. rangeli* reage com poucas lectinas, principalmente aquelas que reconhecem resíduos de manose e glicose, sendo seletivamente aglutinado pela lectina de *Vicia villosa* (D'ALESSANDRO & SARAIVIA, 1992).

As informações referentes à biologia molecular e superfície celular do *T. rangeli* são limitadas. No entanto há evidências que os padrões de expressão de receptores para lectinas no parasita presente no inseto vetor são diferentes daqueles que se encontram no meio de cultura.

Essas diferenças na constituição da superfície e membrana celular e a presença de diferentes componentes aniônicos e catiônicos podem explicar o distinto comportamento das formas epimastigotas e tripomastigotas no que se refere ao processo de fixação destas formas.

4.2 Formas tripomastigotas de cultura de *T. rangeli*

A obtenção de formas tripomastigotas de cultura de *T. rangeli* foi realizada através de diferenciação em meio DMEM pH 8,0 segundo Koerich et al. (2002). Em média a percentagem de diferenciação obtida foi de 75%. Com o objetivo de aumentar esta percentagem, ou seja, reduzir a contaminação com formas epimastigotas foram realizadas alterações no protocolo original.

Schottelius (1982), testando a lise de formas epimastigotas de *T. rangeli* frente a soros de diferentes espécies animais, observou que a lise destas formas ocorria somente na presença de soro de galinha. Com base neste conhecimento, culturas com uma diferenciação em torno de 80% foram incubadas por 30 minutos à 27°C v/v com soro de galinha. Após a incubação, a cultura foi centrifugada a 250 x g

por 5 minutos e incubada novamente em banho-maria à 37°C para que os tripomastigotas migrassem para o sobrenadante, obtendo-se assim uma cultura com uma menor quantidade de epimastigotas contaminantes. Com a utilização deste novo protocolo, a purificação de formas tripomastigotas atingiu em média 95%.

Interessantemente, o protocolo supracitado somente funcionou para a cepa Choachi. Apesar de ocorrer a lise das formas epimastigotas da cepa SC-58, as formas tripomastigotas durante a última etapa do processo não migraram para o sobrenadante, impossibilitando desta maneira sua separação.

Steindel (1993), através da análise dos perfis de RAPD de 16 cepas de *T. rangeli* originárias de diferentes regiões geográficas, utilizando o coeficiente de similaridade de Dice, mostrou 2 grupos distintos de cepas de *T. rangeli*: um formado pelas cepas de Santa Catarina e o outro pelas cepas de Honduras, Colômbia e Venezuela. As diferenças nos perfis de RAPD destas cepas aliada as diferenças verificadas nos perfis antigênicos e isoenzimáticos, sugerem que estas duas populações são geneticamente distintas.

A fraca reatividade de anticorpos monoclonais anti-cepa H8GS com as cepas SC-58 e SC-61 de *T. rangeli*, observada nos testes de imunofluorescência indireta, e a ausência de reação destes monoclonais nos testes de *Western blot* também mostram a existência de variabilidade antigênica em *T. rangeli* (STEINDEL, 1993).

Recentemente, Guhl et al. (2002) caracterizaram 25 cepas de *T. rangeli* isoladas de *R. prolixus* e *R. colombiensis* naturalmente infectados, capturados na Colômbia e Venezuela. Após o isolamento das cepas por inoculação de metatripomastigotas em camundongos e subsequente hemocultura em meio LIT, as cepas foram caracterizadas através da análise do gene do mini-exon. O estudo

comprova um polimorfismo anteriormente revelado, o qual é corroborado pela análise de outros marcadores moleculares como as isoenzimas, RAPD e kDNA (GUHL et al., 2002). Neste sentido, a diferença observada no presente estudo no que refere-se à sensibilidade diferenciada de tripomastigotas de cultura das cepas Choachi e SC-58 frente ao soro de galinha, pode ser devida a comprovada variabilidade biológica e genética destas cepas.

4.3 Reação de Imunofluorescência Indireta - IFI

Com o objetivo de analisar a reatividade sorológica cruzada entre *T. cruzi* e *T. rangeli* foram testados em ensaios de imunofluorescência indireta 26 soros humanos oriundos de pacientes chagásicos crônicos com a forma cardíaca e 13 com a forma indeterminada da doença, frente a formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura das cepas Y e CL de *T. cruzi* e Choachi e SC-58 de *T. rangeli*.

4.3.1 Soros de pacientes com forma Cardíaca X Epimastigotas

A análise dos soros de pacientes chagásicos crônicos apresentando a forma cardíaca da doença demonstrou uma forte reatividade sorológica cruzada quando do uso de formas epimastigotas como antígeno na IFI. A soropositividade foi de 100% tanto contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* quanto com as de *T. rangeli* (Tabela 1). Foi observada uma variação inter-específica significativa ($p < 0,001$) em relação aos títulos das reações, sendo que as reações mais intensas ocorreram quando foram utilizadas as formas epimastigotas de *T. cruzi* (Tabela 1). A

média dos títulos de anticorpos dos soros dos pacientes cardíacos testados contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* foi de 461,54 para a cepa Y, de 369,23 para a cepa CL, de 183,07 para a cepa SC-58 e de 124,61 para a cepa Choachi de *T. rangeli* (Figura 3).

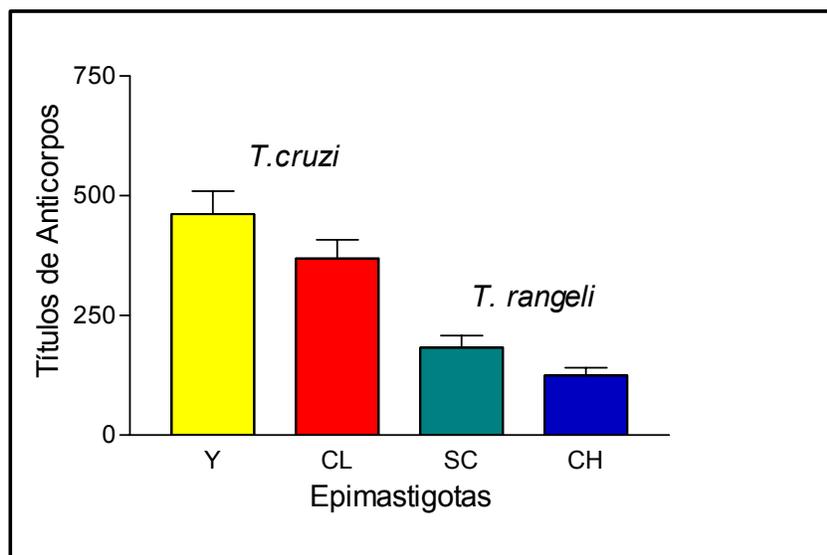


Figura 3. Resultado da média dos títulos de anticorpos dos 26 soros de pacientes chagásicos crônicos apresentando a forma cardíaca da doença frente às formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepas Y e CL) e *T. rangeli* (cepas Choachi e SC-58) em ensaios de imunofluorescência indireta. O erro padrão da média está apresentado acima de cada barra. Epi Y x Epi CL ($p > 0,05$); Epi Y x Epi SC ($p < 0,001$); Epi Y x Epi CH ($p < 0,001$); Epi CL x Epi SC ($p < 0,01$); Epi CL x Epi CH ($p < 0,001$); Epi SC x Epi CH ($p > 0,05$).

A variação intra-específica, ou seja, a diferença de reatividade de um mesmo soro frente às cepas de uma mesma espécie não foi significativa ($p > 0,05$) tanto para *T. cruzi* como para *T. rangeli*. Entretanto o padrão de fluorescência apresentou uma variação inter-específica. Nas formas epimastigotas de *T. rangeli* pôde-se observar uma marcação de membrana mais acentuada (Figura 4 B), enquanto nas formas epimastigotas de *T. cruzi* a fluorescência da maioria dos soros foi mais homogênea, incluindo núcleo e cinetoplasto (Figura 4 A). No entanto, nem todos os soros apresentaram um padrão de fluorescência uniforme frente às formas

epimastigotas de *T. cruzi*. Em alguns soros p \hat{o} de-se observar uma marcação de membrana mais acentuada, contrastando com o padrão observado para a maioria dos soros (Figura 4 C).

A

B

C

Figura 4. Distribuição da fluorescência em formas epimastigotas de *T. cruzi* (A e C) e *T. rangeli* (B) incubadas com soros de pacientes chagásicos crônicos com a forma cardíaca da doença, em ensaios de imunofluorescência indireta, na diluição de 1/40.

4.3.2 Soros de pacientes com forma Indeterminada X Epimastigotas

O padrão de reação dos soros de pacientes chagásicos crônicos com a forma indeterminada da doença, frente às formas epimastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* também revelou uma variação inter-específica significativa ($p < 0,001$), mostrando-se bastante variável tanto em relação ao título como em intensidade. Os maiores títulos, assim como as reações mais intensas, ocorreram quando da utilização de formas epimastigotas de *T. cruzi* como antígeno (Tabela 2). A média dos títulos de anticorpos dos soros dos pacientes com a forma indeterminada da doença testados contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* foi de 323,08 para a cepa Y, 292,31 para a cepa CL, de 46,15 para a cepa SC-58 e de 43,08 para a cepa Choachi de *T. rangeli* (Figura 5). A soropositividade foi de 100% frente às formas epimastigotas de *T. cruzi* e de 46,15% frente às formas epimastigotas de *T. rangeli*.

A reatividade sorológica cruzada foi menos intensa do que a observada com os soros dos pacientes cardíacos, sendo proporcional ao título de anticorpos dos soros testados. Todos os soros com títulos de 1/40 e/ou 1/80 quando incubados com as formas epimastigotas de *T. cruzi* não reagiram com as formas epimastigotas de *T. rangeli* (Tabela 2).

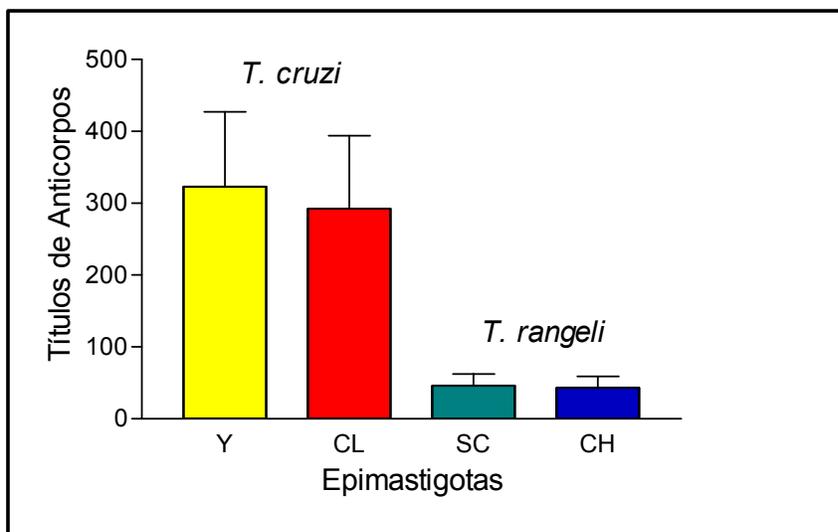


Figura 5. Resultado da média dos títulos de anticorpos dos 13 soros de pacientes chagásicos crônicos apresentando a forma indeterminada da doença frente às formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepas Y e CL) e *T. rangeli* (cepas Choachi e SC-58) em ensaios de imunofluorescência indireta. O erro padrão da média está apresentado acima de cada barra. Epi Y x Epi CL ($p > 0,05$); Epi Y x Epi SC ($p < 0,001$); Epi Y x Epi CH ($p < 0,001$); Epi CL x Epi SC ($p < 0,01$); Epi CL x Epi CH ($p < 0,001$); Epi SC x Epi CH ($p > 0,05$).

Uma variação intra-específica no que tange ao título e a intensidade da reação, da mesma maneira que para a forma cardíaca, não foi significativa ($p > 0,05$). O padrão de fluorescência foi mais homogêneo para epimastigotas de *T. cruzi* (Figura 6 A), enquanto que para epimastigotas de *T. rangeli* a marcação de membrana foi mais acentuada (Figura 6 B).

A

B

Figura 6. Distribuição da fluorescência em formas epimastigotas de *T. cruzi* (A) e *T. rangeli* (B) incubadas com soros de pacientes chagásicos crônicos com a forma indeterminada da doença, em ensaios de imunofluorescência indireta, na diluição de 1/40.

4.3.3 Soros de pacientes com forma Cardíaca X Tripomastigotas

Os soros de pacientes chagásicos crônicos manifestando a forma cardíaca da doença reagiram fortemente com tripomastigotas de *T. cruzi*, porém apresentaram uma reação bem menos intensa com tripomastigotas de *T. rangeli* (Figura 7). A soropositividade, como ocorreu com as formas epimastigotas, também foi de 100% frente as formas tripomastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* (Tabela 1). A média dos títulos de anticorpos destes soros quando testados contra as formas tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* foi de 960 para a cepa Y, de 566,15 para a cepa CL, de 46,15 para a cepa SC-58 e de 52,30 para a cepa Choachi de *T. rangeli*.

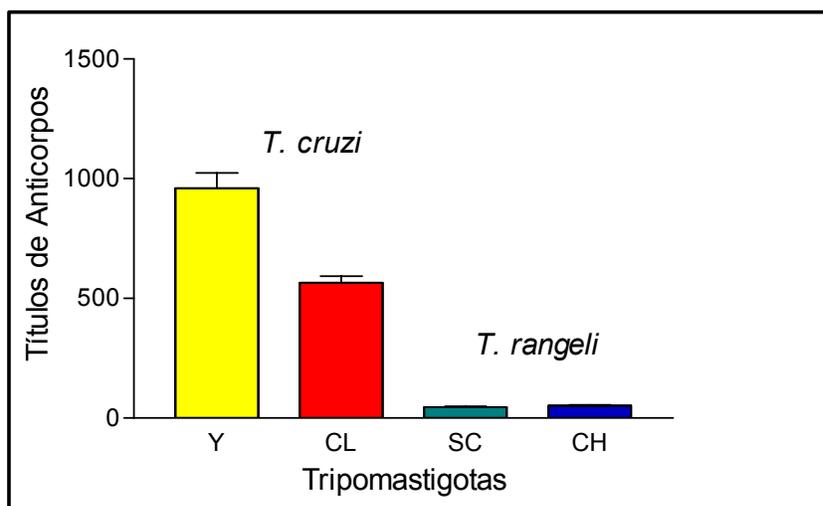


Figura 7. Resultado da média dos títulos de anticorpos dos 26 soros de pacientes chagásicos crônicos apresentando a forma cardíaca da doença frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepas Y e CL) e *T. rangeli* (cepas Choachi e SC-58) em ensaios de imunofluorescência indireta. O erro padrão da média está apresentado acima de cada barra. Tripo Y x Tripo CL ($p > 0,05$); Tripo Y x Tripo SC ($p < 0,001$); Tripo Y x Tripo CH ($p < 0,001$); Tripo CL x Tripo SC ($p < 0,001$); Tripo CL x Tripo CH ($p < 0,001$); Tripo SC x Tripo CH ($p > 0,05$).

Em relação à intensidade da reação, foi observada uma variação inter-específica significativa ($p < 0,001$) sendo menos intensas as reações com

tripomastigotas de *T. rangeli*, não ocorrendo o mesmo na análise intra-específica ($p>0,05$). Esse mesmo comportamento ocorreu com os padrões de fluorescência. As formas tripomastigotas de *T. cruzi* apresentaram um padrão mais homogêneo, porém com uma acentuada marcação de membrana (Figura 8 A), já nas formas tripomastigotas de *T. rangeli*, apenas uma discreta marcação de membrana e a presença de grânulos citoplasmáticos foi observada (Figura 8 B).

A

B

Figura 8. Distribuição da fluorescência em formas tripomastigotas de *T. cruzi* (A) e *T. rangeli* (B) incubadas com soros de pacientes chagásicos crônicos com a forma cardíaca da doença, em ensaios de imunofluorescência indireta, na diluição de 1/40.

4.3.4 Soros de pacientes com forma Indeterminada X Tripomastigotas

A reatividade dos soros de pacientes chagásicos com a forma indeterminada da doença frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi, na grande maioria das análises, mais intensa quando comparada com as formas epimastigotas do referido parasita (Figura 5 e Figura 9). No entanto, os soros que apresentaram títulos de 1/40 e 1/80 quando testados previamente contra formas epimastigotas de *T. cruzi*, não reagiram com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* ou de *T. rangeli* (Tabela 2). A soropositividade foi de 46,15% tanto frente as formas tripomastigotas de *T. cruzi* como de *T. rangeli*.

Apenas os soros com títulos iguais ou superiores a 1/320 frente às formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, apresentaram uma reatividade sorológica cruzada com tripomastigotas de *T. rangeli*, mesmo assim, numa intensidade menor do que a observada com as formas epimastigotas de *T. rangeli* (Tabela 2). A média dos títulos de anticorpos dos soros testados contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi de 685,71 para a cepa Y, de 640 para a cepa CL e de 45,71 para as cepas SC-58 e Choachi de *T. rangeli*, não ocorrendo uma variação intra-específica significativa ($p>0,05$).

Em função do elevado número de soros com resultados não reativos (6/13), uma nova análise estatística foi realizada considerando somente os resultados reagentes quando foi observada uma variação inter-específica significativa ($p<0,001$) (Figura 9).

Em relação ao comportamento do padrão de fluorescência, o mesmo foi semelhante ao observado para os soros de pacientes com a forma cardíaca, sendo mais homogêneo nas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, incluindo núcleo e

cinetoplasto, e apresentando apenas uma marcação de membrana nas formas tripomastigotas de *T. rangeli*.

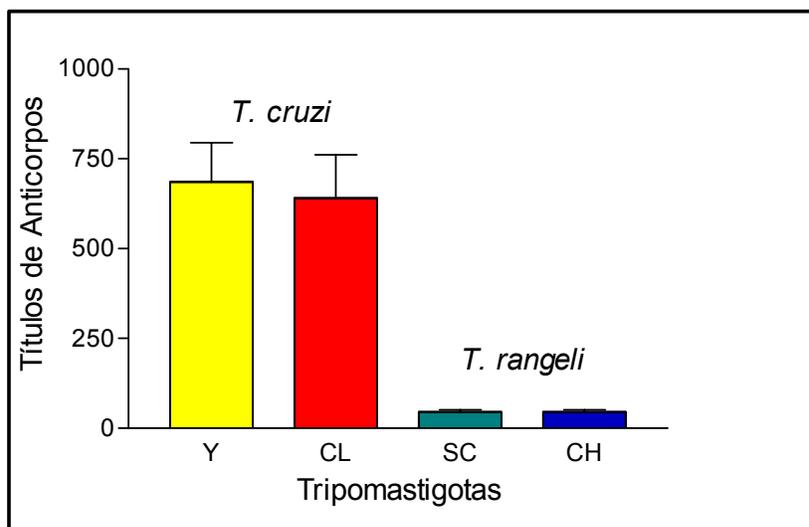


Figura 9. Resultado da média dos títulos de anticorpos dos 13 soros de pacientes chagásicos crônicos apresentando a forma indeterminada da doença frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepas Y e CL) e *T. rangeli* (cepas Choachi e SC-58) em ensaios de imunofluorescência indireta. O erro padrão da média está apresentado acima de cada barra. Tripo Y x Tripo CL ($p > 0,05$); Tripo Y x Tripo SC ($p < 0,05$); Tripo Y x Tripo CH ($p < 0,05$); Tripo CL x Tripo SC ($p < 0,05$); Tripo CL x Tripo CH ($p < 0,05$); Tripo SC x Tripo CH ($p > 0,05$).

Tabela 1. Resultado dos títulos e da intensidade de reação, no título de 1/40, dos 26 soros de pacientes chagásicos cardíacos testados contra formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura das cepas Y e CL de *T. cruzi* e SC-58 e Choachi (CH) de *T. rangeli*.

| Soros | Epimastigota | | | | Tripomastigota | | | |
|-------|--------------|-------------|-------------|-----------|----------------|-------------|--------|--------|
| | Y | CL | SC-58 | CH | Y | CL | SC-58 | CH |
| 1 | 1/640 +++++ | 1/640 +++ | 1/160 ++ | 1/160 +++ | 1/640 +++++ | 1/640 +++++ | 1/40 + | 1/80 + |
| 2 | 1/320 +++ | 1/160 +++ | 1/80 + | 1/80 + | 1/640 +++ | 1/640 +++ | 1/40 + | 1/80 + |
| 3 | 1/320 +++++ | 1/320 +++ | 1/320 +++ | 1/160 +++ | 1/640 +++++ | 1/320 +++++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 4 | 1/160 +++ | 1/320 +++ | 1/160 ++ | 1/80 ++ | 1/640 +++++ | 1/640 +++++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 5 | 1/320 +++ | 1/160 +++ | 1/160 +++ | 1/160 +++ | 1/640 +++++ | 1/640 +++++ | 1/80 + | 1/80 + |
| 6 | 1/320 +++++ | 1/320 +++ | 1/80 + | 1/80 + | 1/640 +++++ | 1/320 +++++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 7 | 1/320 +++ | 1/320 +++ | 1/160 ++ | 1/80 + | 1/640 +++++ | 1/320 +++++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 8 | 1/320 +++++ | 1/320 ++ | 1/160 +++ | 1/160 ++ | 1/640 +++++ | 1/640 +++++ | 1/40 + | 1/80 + |
| 9 | 1/160 +++ | 1/160 ++ | 1/40 + | 1/40 + | 1/640 +++++ | 1/320 +++++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 10 | 1/320 +++++ | 1/320 +++ | 1/80 ++ | 1/80 + | 1/1280 +++++ | 1/640 +++++ | 1/40 + | 1/80 + |
| 11 | 1/160 +++++ | 1/160 ++ | 1/80 ++ | 1/40 + | 1/1280 +++++ | 1/640 +++++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 12 | 1/320 +++ | 1/160 +++ | 1/80 + | 1/80 + | 1/640 +++ | 1/320 +++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 13 | 1/320 +++ | 1/160 ++ | 1/160 ++ | 1/80 + | 1/640 +++ | 1/320 +++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 14 | 1/640 +++++ | 1/640 +++ | 1/320 +++++ | 1/320 +++ | 1/1280 +++++ | 1/640 +++++ | 1/80 + | 1/80 + |
| 15 | 1/640 +++++ | 1/640 +++ | 1/320 +++++ | 1/160 ++ | 1/1280 +++++ | 1/640 +++++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 16 | 1/1280 +++++ | 1/640 +++++ | 1/640 +++ | 1/320 +++ | 1/640 +++++ | 1/640 +++++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 17 | 1/320 +++ | 1/160 ++ | 1/80 ++ | 1/40 ++ | 1/1280 +++++ | 1/640 +++++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 18 | 1/320 +++++ | 1/160 ++ | 1/80 ++ | 1/80 + | 1/1280 +++++ | 1/640 +++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 19 | 1/640 +++ | 1/640 +++ | 1/320 +++ | 1/160 ++ | 1/1280 +++++ | 1/640 +++ | 1/80 + | 1/80 + |
| 20 | 1/640 +++++ | 1/320 ++ | 1/160 +++ | 1/160 ++ | 1/1280 +++++ | 1/640 +++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 21 | 1/640 +++++ | 1/640 +++++ | 1/160 +++ | 1/80 +++ | 1/1280 +++++ | 1/640 +++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 22 | 1/640 +++++ | 1/320 ++ | 1/160 +++ | 1/80 +++ | 1/1280 +++++ | 1/640 +++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 23 | 1/640 +++ | 1/640 +++ | 1/160 ++ | 1/80 ++ | 1/1280 +++++ | 1/640 +++++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 24 | 1/640 +++++ | 1/640 +++++ | 1/160 ++ | 1/80 ++ | 1/640 +++++ | 1/640 +++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 25 | 1/320 +++ | 1/320 ++ | 1/320 ++ | 1/320 ++ | 1/1280 +++++ | 1/640 +++++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 26 | 1/640 +++++ | 1/320 ++ | 1/160 +++ | 1/80 ++ | 1/1280 +++++ | 1/640 +++++ | 1/80 + | 1/80 + |

Tabela 2. Resultado dos títulos e da intensidade de reação, no título de 1/40, dos 13 soros de pacientes chagásicos com a forma indeterminada da doença testados contra formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura das cepas Y e CL de *T. cruzi* e SC-58 e Choachi (CH) de *T. rangeli*.

| Soros | Epimastigota | | | | Tripomastigota | | | |
|-----------|--------------|--------------|-----------|----------|----------------|--------------|--------|--------|
| | Y | CL | SC-58 | CH | Y | CL | SC-58 | CH |
| 1 | 1/40 + | 1/40 + | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 2 | 1/40 + | 1/40 + | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 3 | 1/640 +++++ | 1/640 +++++ | 1/160 ++ | 1/160 ++ | 1/640 +++++ | 1/640 +++++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 4 | 1/160 +++ | 1/160 +++ | 1/40 + | 1/40 + | 1/320 +++ | 1/320 +++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 5 | 1/80 + | 1/80 + | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 6 | 1/40 + | 1/40 + | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 7 | 1/640 +++++ | 1/640 +++++ | 1/80 ++ | 1/80 ++ | 1/640 +++++ | 1/640 +++++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 8 | 1/1280 +++++ | 1/1280 +++++ | 1/160 +++ | 1/160 ++ | 1/1280 +++++ | 1/1280 +++++ | 1/80 + | 1/80 + |
| 9 | 1/160 +++ | 1/80 +++ | 1/40 + | 1/40 + | 1/640 +++++ | 1/320 +++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 10 | 1/320 +++++ | 1/320 +++++ | 1/80 ++ | 1/40 + | 1/640 +++++ | 1/640 +++++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 11 | 1/80 + | 1/80 + | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 12 | 1/640 +++++ | 1/320 +++++ | 1/40 + | 1/40 + | 1/640 +++++ | 1/640 +++++ | 1/40 + | 1/40 + |
| 13 | 1/80 + | 1/80 ++ | NR | NR | NR | NR | NR | NR |

* NR - Não reativo

A reatividade sorológica cruzada entre formas epimastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* tem sido demonstrada por diferentes autores em ensaios de imunofluorescência indireta e *imunoblot* (ACOSTA et al., 1991; STEINDEL, 1993; SALDAÑA et al., 1995).

Afchain et al. (1979) comparou a composição antigênica de extratos solúveis de formas epimastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* por imunoeletroforese e concluiu que 60% dos antígenos identificados são comuns a ambas as espécies.

Saldaña et al. (1995) observaram através de *Western blot* que soros de camundongos infectados com *T. cruzi* também apresentam anticorpos reativos

contra antígenos de *T. rangeli*. Estes resultados confirmam a reatividade sorológica cruzada das formas epimastigotas destes dois parasitas. Os antígenos de *T. rangeli* reconhecidos pelos anticorpos anti-*T. cruzi* no início da infecção foram caracterizados como sendo de alto peso molecular (116, 100, 81, 76, e 71 kDa) e, após algumas semanas, proteínas de baixo peso molecular (37 – 23 kDa) também foram reconhecidas.

Guhl et al. (1985) descreveram uma glicoproteína majoritária de 73 kDa (GP 73), na superfície de formas epimastigotas de *T. rangeli* que parece estar associada com as reações sorológicas cruzadas com o *T. cruzi*.

Guhl et al. (1987) utilizando soros de pacientes infectados pelo *T. cruzi* e pelo *T. rangeli* e soros de pacientes apresentando infecções mistas por estes parasitas, verificaram uma alta reatividade cruzada destes soros com antígenos destes dois parasitas em testes de IFI e ELISA quando foram utilizados parasitas íntegros e antígenos brutos.

Steindel (1993) através de reações de imunofluorescência indireta, utilizando soros policlonais anti-*T. cruzi* e anti-*T. rangeli*, obtidos a partir da imunização de camundongos com extratos totais, demonstrou uma elevada reatividade cruzada entre as formas epimastigotas destes dois parasitas. Os soros anti-*T. cruzi* promoveram reações de fluorescência intensa na membrana e grânulos citoplasmáticos dos parasitas de todas as cepas de *T. cruzi* estudadas. Entretanto, os parasitas das cepas de *T. rangeli* apresentaram reações bem menos intensas e apenas nos grânulos citoplasmáticos.

Ensaio de *Western blot* utilizando antígenos totais de formas epimastigotas de cultura das cepas Y e SC-28 de *T. cruzi* e das cepas SC-58 e H8GS de *T. rangeli* frente aos seus respectivos soros imunes homólogos e heterólogos mostraram um

elevado grau de reatividade cruzada, confirmando a presença de antígenos comuns entre estes dois parasitas (STEINDEL, 1993).

Face à utilização rotineira da reação de imunofluorescência indireta no diagnóstico da doença de Chagas, da comprovada reatividade sorológica cruzada entre *T. cruzi* e *T. rangeli* e da sua ocorrência simpátrica em uma ampla área geográfica, o presente estudo objetivou quantificar e avaliar comparativamente esta reatividade cruzada utilizando diferentes formas parasitárias como antígenos e soros de pacientes com diferentes formas clínicas da doença.

Em relação à reatividade com formas epimastigotas, todos os soros dos pacientes cardíacos testados reagiram fortemente tanto com o *T. cruzi* como com o *T. rangeli*, corroborando os dados da literatura (Tabela 1). No entanto, os títulos obtidos e a intensidade das reações foram variáveis, sendo mais intensas frente às formas epimastigotas de *T. cruzi*. Já a reatividade dos soros dos pacientes com a forma indeterminada frente à formas epimastigotas foi menos intensa e proporcional ao título de anticorpos (Tabela 2).

Esta reatividade diferenciada pode estar relacionada, entre outras coisas, a existência de diferentes perfis de anticorpos nos soros testados e a diferenças qualitativas e quantitativas em relação aos antígenos testados.

Saldaña & Sousa (1996b) avaliaram por *immunoblotting* o perfil antigênico das formas epimastigotas de 3 cepas de *T. cruzi* e *T. rangeli*, utilizando anticorpos policlonais. A análise das reações obtidas com anticorpos anti-*T. rangeli* frente às formas epimastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli*, revelaram bandas antigênicas de 81, 76, 71, 63, 58-60, 54, 51, 49, 43, 39, 34, 29 e 24 kDa para *T. rangeli*, e bandas de 81, 76, 71, 58-60, 34, 29 e 23 kDa para *T. cruzi*. Já os resultados obtidos com os anticorpos anti-*T. cruzi*, revelaram um padrão diferente, com bandas de 82, 81, 77,

71, 67, 54 e 24 kDa reconhecidas no perfil antigênico de *T. rangeli*, e bandas de 92, 86, 83, 82, 81, 77, 71, 67, 57, 44, 39, 36, 28, e 23kDa em *T. cruzi*. Tanto as formas epimastigotas de *T. cruzi* como de *T. rangeli* apresentaram um perfil antigênico mais complexo, com um número maior de bandas, quando testadas frente a seus soros homólogos.

Recentemente, alguns estudos tentam correlacionar o perfil de isotipos de anticorpos anti-*T.cruzi* com as diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas (MORGAN et al., 1996).

Sabidamente, os soros de pacientes com cardiopatia chagásica apresentam altos títulos de IgM, quando comparados com indivíduos na fase indeterminada da doença, o que é consistente com a teoria de que a auto-imunidade pode contribuir para a cardiopatia chagásica. Os soros provenientes de pacientes com envolvimento gastrintestinal apresentam níveis elevados de IgA, enquanto aqueles oriundos de pacientes com manifestações mistas do tipo cardíaca-intestinais mostram títulos elevados de IgG 2 (MORGAN et al., 1998).

Mais recentemente, foi realizada uma análise através do exame de especificidade antigênica da resposta de IgG 1, 2, 3 IgM, e IgA de pacientes com diferentes manifestações clínicas por *Western blot*. Observou-se, então, que IgG 3 da maioria dos indivíduos da forma digestiva liga-se ao antígeno de 68 kDa, enquanto que anticorpos provenientes de pacientes com a forma cardíaca raramente detectam essa molécula. Além disso, os perfis de reconhecimento antigênico por cada isotipo diferem drasticamente dos perfis de outros isotipos independentemente da forma clínica da doença (MINEO et al., 1996; MORGAN et al., 1998).

Há fortes indicações, assim, de que os anticorpos anti-*T. cruzi* apresentam um painel de reatividade distinto em pacientes com diferentes formas clínicas. É possível que essas diferenças reflitam mecanismos imunorreguladores diversos, com a participação de citocinas influenciando a expressão de diferentes classes de imunoglobulinas, e envolvidos com os distintos cursos da doença (MINEO et al., 1996; MORGAN et al., 1998).

Umezawa et al. (1996) descreveram diferenças na resposta imune humoral entre soros humanos chagásicos obtidos na fase aguda e crônica da doença, utilizando quatro preparações antigênicas obtidas de *T. cruzi* e que refletem o conteúdo de superfície e interno encontrado nas formas tripomastigotas.

A proporção de IgG dirigida a antígenos de superfície dos tripomastigotas foi maior em soros agudos que nos crônicos, enquanto o oposto foi observado nos antígenos internos do parasita (UMEZAWA et al., 1996).

Em outro estudo, realizado em crianças bolivianas, residentes em três diferentes áreas endêmicas, verificou-se que parâmetros sorológicos e bioquímicos poderiam definir os diferentes estágios da infecção aguda pelo *T. cruzi* (MEDRANO-MERCADO et al., 1996).

Todas essas mudanças observadas no perfil das imunoglobulinas, durante as diferentes fases da doença e nas manifestações clínicas refletem complexos mecanismos imunorreguladores que devem, em última instância, influenciar os perfis de reatividade e o curso da infecção pelo *T. cruzi*.

No presente estudo em relação a intensidade e ao padrão de fluorescência das reações, não foi observada uma variação intra-específica significativa ($p > 0,05$) entre as cepas SC-58 e Choachi de *T. rangeli*, as quais apresentaram um padrão de reação e fluorescência semelhantes entre si, tendo ocorrido o mesmo entre as

cepas Y e CL de *T. cruzi*. No entanto, uma variação inter-específica significativa ($p < 0,001$) ocorreu em relação aos títulos e ao padrão de fluorescência nas diferentes formas clínicas.

As formas epimastigotas de *T. cruzi* quando testadas com os soros de pacientes cardíacos apresentaram um padrão de fluorescência que variou de homogêneo, incluindo núcleo e cinetoplasto (Figura 4 A), a uma marcação de membrana mais acentuada (Figura 4 C). Já frente aos soros dos pacientes com a forma indeterminada o padrão de fluorescência foi mais homogêneo (Figura 6 A). Estas variações no padrão de fluorescência poderiam ser explicadas pela variabilidade antigênica que reflete uma variabilidade genética do *T. cruzi*.

Andrade et al. (1999) verificaram, através da análise de tecidos de camundongos infectados, uma clara distribuição diferencial dos diferentes clones de *T. cruzi*, indicando que a variabilidade genética do parasita é um dos grandes fatores que influenciam na patogênese da doença de Chagas. Esta variabilidade reflete um polimorfismo genético no que diz respeito as glicoproteínas de superfície, que estão relacionadas com fenômenos de reconhecimento e adesão celular e que podem estar envolvidas na distribuição tecidual diferenciada.

Recentes estudos de microsátélites demonstram claramente que as cepas de *T. cruzi* são freqüentemente multiclonais, e que conseqüentemente a maioria dos pacientes chagásicos podem facilmente ter sido infectados por pelo menos dois diferentes clones de *T. cruzi*, o que determinaria padrões distintos de respostas imunes em um mesmo indivíduo (ANDRADE et al., 1999).

De forma geral, no presente estudo, o padrão de fluorescência das formas epimastigotas de *T. rangeli* mostrou-se uniforme, com acentuada marcação de

membrana, independente do uso de soros obtidos das duas formas clínicas da doença de Chagas (Figura 4 B e 6 B).

Diferenças no padrão de fluorescência de formas epimastigotas de *T. rangeli* já foram anteriormente relatadas. Vázquez et al. (1997) através da análise de 65 soros de crianças panamenhas, observaram três padrões de fluorescência em formas epimastigotas de *T. rangeli*: (I) padrão homogêneo, incluindo núcleo e cinetoplasto, (II) presença de grânulos citoplasmáticos e (III) fluorescência flagelar.

Embora o *T. rangeli* e o *T. cruzi* compartilhem aproximadamente 60% dos antígenos de superfície é possível determinar polipeptídeos específicos para cada espécie, sendo que antígenos (38, 43 e 48 Kda) já foram purificados e parcialmente caracterizados como sendo marcadores específicos para *T. rangeli* (AFCHAIN et al., 1979).

Saldaña et al. (1993) através de análise em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), conseguiram diferenciar *T. cruzi* de *T. rangeli* baseados principalmente em 4 proteínas exclusivas do *T. rangeli* que apresentaram massa molecular de 93, 77-73, 63 e 54-52 KDa. Estes mesmos autores identificaram por eletroforese e *Western blot* uma proteína de 48 KDa específica de epimastigotas de *T. rangeli* (SALDAÑA, 1997).

Assim sendo, a variação no padrão de fluorescência pode ser decorrência da variabilidade antigênica dos dois parasitas, uma vez que o *T. rangeli* possui um perfil de proteínas muito mais rico, sugerindo que sua superfície celular, pelo menos das formas epimastigotas, é mais complexa do que os componentes presentes na superfície celular das formas epimastigotas de *T. cruzi*. Conseqüentemente, a existência de diferentes epítomos de ligação para os anticorpos deve ser levada em consideração (SALDAÑA, 1997).

A complexidade da superfície celular do *T. rangeli* pode ser entendida se levarmos em conta características distintas de seu ciclo biológico como seu padrão de desenvolvimento no inseto vetor, que envolve a migração do estômago para a hemocele, internalização em hemócitos e a invasão das glândulas salivares. Todos esses eventos necessitam de processos de reconhecimento, adesão e penetração de diversas barreiras, sendo que a presença de moléculas de superfície específicas que propiciem esta interação são essenciais (SALDAÑA, 1997).

A utilização de formas tripomastigotas como antígeno nas reações de IFI resultou em uma redução significativa ($p < 0,001$) da reatividade sorológica cruzada entre *T. cruzi* e *T. rangeli*, tanto em relação ao título como em relação à intensidade das reações (Tabela 1 e 2).

De uma maneira geral, os soros dos pacientes, apresentaram uma reatividade mais intensa frente à tripomastigotas de *T. cruzi* quando comparada com as formas epimastigotas (Tabela 1 e 2).

Steindel (1993) avaliou em testes de imunofluorescência indireta a interação de formas de cultura de diferentes cepas de *T. cruzi* e *T. rangeli* com anticorpos monoclonais, revelando que as cepas destes parasitas são heterogêneas. Os quatro anticorpos monoclonais anti-cepa Y de *T. cruzi* induzidos contra tripomastigotas sanguíneos foram espécie-específicos, mas não estágio-específicos, pois reconheceram formas epimastigotas de cultura. Esta reatividade deve-se à existência de antígenos comuns entre os diferentes estágios evolutivos do parasita.

A maior reatividade frente as formas tripomastigotas de *T. cruzi* pode ser explicada com base na especificidade dos anticorpos, uma vez que durante a infecção os anticorpos são produzidos contra estas formas.

Nos pacientes chagásicos crônicos com a forma indeterminada, apenas os soros com títulos iguais ou superiores a 1/320 frente à formas tripomastigotas de *T. cruzi* reagiram com tripomastigotas de *T. rangeli*, mesmo assim com uma intensidade reduzida.

Levando-se em consideração a forte reatividade sorológica cruzada frente às formas epimastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* e o fato de compartilharem aproximadamente 60% dos antígenos solúveis de superfície, a redução considerável da reatividade cruzada quando utilizadas as formas tripomastigotas pode ser decorrência da constituição antigênica distinta nestas formas evolutivas de *T. cruzi* e *T. rangeli*, corroborando os estudos de perfis antigênicos (AFCHAIN et al., 1979).

Como ocorreu com as formas epimastigotas, não foi observada uma variação intra-específica significativa ($p > 0,05$) em relação a intensidade e padrão de fluorescência quando do uso de formas tripomastigotas como antígenos (Tabela 1 e 2).

O padrão de fluorescência das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, independentemente da forma clínica, apresentou-se homogêneo, com uma acentuada marcação de membrana assim como no núcleo e cinetoplasto (Figura 8 A). Já nas formas tripomastigotas de *T. rangeli*, apenas uma discreta marcação de membrana pôde ser constatada (Figura 8 B).

A ausência de uma variação no padrão de fluorescência quando do uso de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, pode ser conseqüência da especificidade dos anticorpos que se ligariam a um número muito maior de epítopos, originando assim, um padrão de fluorescência homogêneo e uniforme.

Os soros provenientes de pacientes com a forma indeterminada, que apresentaram títulos de 1/40 e 1/80 frente à formas epimastigotas de *T. cruzi*, não

reagiram com as formas epimastigotas de *T. rangeli* (Tabela 2). Esta ausência de reatividade, pode ser consequência da baixa quantidade de anticorpos, uma vez que a maioria dos soros quando testados com epimastigotas de *T. rangeli* apresentaram uma diminuição de no mínimo, dois títulos em relação aos títulos obtidos com epimastigotas de *T. cruzi*. Entretanto, considerando que a maioria (76%) dos soros de pacientes chagásicos apresentam título igual ou superior a 1/640, sendo raros (1,4%) os soros com títulos inferiores a 1/160 (CAMARGO, 1966) e que no presente estudo todos os soros que apresentaram um título elevado cruzaram com as formas epimastigotas de *T. rangeli*, poderíamos suspeitar de resultados falso-positivos para os soros com títulos igual a 1/40 e 1/80. Esta hipótese foi corroborada pelo fato de que estes mesmos soros não reagiram com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Tabela 2).

É clássico o reconhecimento de reações sorológicas cruzadas entre diferentes infecções no diagnóstico de rotina, principalmente quando são utilizados antígenos não-purificados. Apesar de infreqüente e apresentar títulos menores do que os habitualmente observados em pacientes chagásicos, a existência de reações cruzadas com outras doenças, como toxoplasmose, leishmaniose, hanseníase, tuberculose e doenças auto-imunes tem sido relatada (CAMARGO, 1992).

Com base nestes dados, nos resultados obtidos e aliado ao fato de que atualmente o teste sorológico de referência para a doença de Chagas é a imunofluorescência indireta, surge a preocupação, em relação a considerar ou não como chagásicos, pacientes apresentando um título de 1/40 e 1/80 nas reações de IFI.

O ônus que a doença produz é o quarto na América Latina, e não está relacionado apenas aos custos com internações, tratamento e o absenteísmo, mas

também com a sobrecarga previdenciária, uma vez que é responsável em áreas endêmicas brasileiras, por 9,1% de todas as pensões por invalidez (ZICKER, 1985; YVES et al., 2002). Nesse contexto, o correto diagnóstico da doença de Chagas e a redução ou eliminação de reações sorológicas cruzadas são de suma importância.

Em virtude da diminuição da reatividade sorológica cruzada, observada neste estudo, a utilização de formas tripomastigotas pode se tornar uma ferramenta adicional no que se refere ao diagnóstico de reações cruzadas, principalmente em regiões onde existe a ocorrência simpátrica *T. cruzi* / *T. rangeli* e no diagnóstico laboratorial de pacientes assintomáticos.

No entanto, mais estudos devem ser realizados utilizando um número maior de cepas de ambos os parasitas, incluindo amostras de soros de pacientes infectados com *T. rangeli*, fato este não possível no presente estudo.

5.0 CONCLUSÕES

- Em relação ao processo de fixação de antígenos para IFI, as formas tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* e *T. rangeli* apresentaram um comportamento distinto do observado nas formas epimastigotas.
- Foi padronizado um novo protocolo para a fixação das formas tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* e *T. rangeli*.
- A utilização de soro de galinha proporcionou a obtenção de culturas com uma proporção maior (90–95%) de tripomastigotas de *T. rangeli*.
- Foi padronizado um novo protocolo para a utilização do soro de galinha na purificação das formas tripomastigotas de *T. rangeli*.
- Não foi possível utilizar o novo protocolo de purificação de formas tripomastigotas de cultura padronizado com soro de galinha para a cepa SC-58 de *T. rangeli*.
- Foi observada uma forte reatividade cruzada dos soros de pacientes chagásicos crônicos apresentando as formas cardíaca e indeterminada da doença frente às formas epimastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli*, havendo porém uma distinção na intensidade da reação.

- Os soros dos pacientes com títulos de 1/40 e 1/80 frente a formas epimastigotas de *T. cruzi*, não reagiram com as formas epimastigotas de *T. rangeli* e tripomastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli*.
- Considerando i) a intensidade de reação, ii) o título e iii) o padrão de fluorescência dos diferentes soros testados frente à formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli*, apenas uma variação inter-específica significativa ($p < 0,001$) pôde ser observada. As reações mais intensas e com maior título foram obtidas com a utilização de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*.
- Uma diminuição da reatividade cruzada, tanto em relação ao título como em intensidade, pôde ser observada com a utilização das formas tripomastigotas de cultura de *T. rangeli*.

6.0 PERSPECTIVAS

Como continuidade deste trabalho, estamos realizando a análise dos perfis antigênicos de ambas as formas epimastigotas e tripomastigotas das cepas de *T. rangeli* e *T. cruzi*, através de ensaios de *Western blot*, utilizando soros de pacientes chagásicos com as formas cardíaca e indeterminada, assim como soros de pacientes chagásicos agudos gentilmente cedidos pela Universidade Mayor de San Simón (Cochabamba, Bolívia).

Ainda faz parte de nossas perspectivas a obtenção de soros de pacientes infectados pelo *T. rangeli*, a fim de verificar o padrão de reatividade sorológica cruzada em IFI assim como sua utilização nos ensaios de *Western blot* supracitados.

7.0 REFERÊNCIAS

ACOSTA, L. et al. Trypanosomatid isolates from Honduras: Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 6, p. 676-683, 1991.

AFCHAIN, D. et al. Antigenic make – up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: Identification of a specific component. **J. Parasitol.**, v. 65, p. 314-507, 1979.

ANDRADE, L. et al. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 100, p. 163-172, 1999.

ARAÚJO, F. G.; HANDMAN, E.; REMINGTON, J. S. Binding of lectins to the cell surface of *Trypanosoma cruzi*. **J. Protozool.**, v. 24, p. 397-400, 1980.

BASSO, B.; MORETTI, E. R. A.; VOTTERO-CIMA, E. Immune response and *Trypanosoma cruzi* infection in *Trypanosoma rangeli* – immunized mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, p. 413-19, 1991.

BITTENCOURT, A.L. Transmissão Vertical da Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e doença de chagas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 16-19.

CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 8, p. 227-234, 1966.

CAMARGO, M.E. Serological diagnosis – An Appraisal of Chagas disease serodiagnosis. In: WENDEL, S. et al. Chagas disease (American Trypanosomiasis), its impact on transfusion and clinical medicine. **São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, p. 165-178, 1992.

CAMARGO, P. A. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 6, p. 93 – 100, 1964.

COURA, J.R. et al. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, p. 278-279, 1996.

COUTINHO, J. D. & NUSSENZWEIG, V. Infecção experimental de triatomíneos pelo *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. **Folia. Clin. Biol.**, v. 18, p. 181-188, 1952

CUBA CUBA, C. et al. Hallazgo de *Rhodnius ecuadoriensis* Lent & León, 1958 infectado naturalmente por trypanosomas semejantes a *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 en caserios del distrito de Cascas, Contumazá, Dep. de Cajamarca, Peru. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v. 14, p. 191-202, 1972.

CUBA CUBA, C. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, n. 2, p. 207-220, 1998.

D' ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In: LUMSDEN, W. H. R. and EVANS, D. A. **Biology of the kinetoplastida**, v. 1, London: Academic, p. 327-403, 1976.

D' ALESSANDRO, A. & SARAVIA, N.G. *Trypanosoma rangeli*. In: KREIRER, J. P. & BAKER, J. P. **Parasitic Protozoa**, 2. ed. London: Academic Press, p. 1-54, 1992.

D' ALESSANDRO, A. & SARAVIA, N. G. *Trypanosoma rangeli*. In: GILLES HERBERT, M. **Protozoal Disease**. v. 2. Oxford: University Press, p. 398-412, 1998.

De LEON, J. R. El *Trypanosoma rangeli* observado em seres humanos em Guatemala. Publicaciones del Instituto de Investigaciones Cientificas, Universidad de San Carlos de Guatemala, n. 3, 32p, 1949.

De LEON, J. R. Trypanosomiasis humana por el *Trypanosoma rangeli* en Guatemala. Publicaciones del Instituto de Investigaciones Cientificas, Universidad de San Carlos de Guatemala, n. 8, 12p, 1952.

De SOUZA, W. Structural organization of the cell surface of pathogenic protozoa. **Micron.**, v. 26, p. 405-430, 1995.

DEANE, L. M. Encontro de tripanosomo do tipo *rangeli* em gambás da espécie *Didelphis marsupialis marsupialis*, no Estado do Pará. **Rev. Bras. Malariol. D. Trop.**, v. 10, p. 451-458, 1958 a.

DEANE, L. M. Novo hospedeiro de tripanosomos do tipo *cruzi* e *rangeli* encontrados no Estado do Pará: o marsupial *Metachirops opossum opossum*. **Rev. Bras. Malariol. D. Trop.**, v. 10, p. 531-541, 1958 b.

DIAS, A.C.P. The indeterminate form of Human Chronic Chagas'disease. A clinical epidemiological study. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.**, v. 22, n. 3, p. 147, 1989.

FERNANDES, A. J. et al. Interrelações entre os ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, p. 473-480, 1994.

FERREIRA, A. W. et al. Aspectos da padronização de testes sorológicos para a doença de Chagas: um teste imunoenzimático para a triagem de doadores de sangue. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 33, p. 123-128, 1991.

GONÇALVES, A. M. et al. Schizodeme analysis with the restriction endonuclease RSA I differentiates between *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 4, p. 477-478, 1991.

GREWAL, M. S. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in its vertebrate and invertebrate hosts. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, p. 301-302, 1956.

GRISARD, E.C. et al. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in central and south America: an overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 203-209, Mar/Apr, 1999.

GRISARD, E.C.; CAMPBELL, D.A.; ROMANHA, A. J. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. **Parasitology**, v.118, p. 375-382, 1999.

GUARNERI, A.A. Alguns Aspectos da Biologia de *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemíptera Reduviidae) infectados ou não pelo *Trypanosoma rangeli*, em condições de laboratório. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC; Trabalho de Conclusão de Curso. 43pp, 1996.

GUHL, F. & MARINKELLE, C. J. Antibodies against *Trypanosoma cruzi* in mice infected with *T. rangeli*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 76, p. 361, 1982.

GUHL, F. et al. Antibody response to experimental *Trypanosoma rangeli* infection and its implications for immunodiagnosis of South American trypanosomiasis. **Acta Tropica**, v. 42, p. 312-18, 1985.

GUHL, F. et al. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. **Parasitology**, v. 94, p. 475-484, 1987.

GUHL, F. et al. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Archives of Medical Research**, v. 33, p. 362-370, 2002.

HECKER, H.; SCHWARZENBACH, M.; RUDIN, W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. **Parasitol. Res.**, v. 76, p. 311-318, 1990.

HOARE, C.A. The Trypanosomes of mammals: A zoological monograph. Oxford: **Blackwell Scientific Publications**, p. 288-314, 1972.

HOARE, C.A.; WALLACE, F.G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**, v. 244, p. 69-70, 1996.

HUDSON, L. et al. Longitudinal studies of the immune response of Colombian patients infected with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Parasitology**, v. 96, p. 449-460, 1992.

JAMES, K. Immunoserology in infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 3, p. 132-152, 1990.

KATZIN, A. M. et al. Receptores para lectinas en la superficie del estadio tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 40, p. 85-90, 1980.

KATZIN, A. M.; & COLLI, W. Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi* an N-acetil-D-glucosamine-containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. **Biochem. Biophys Acta**, v. 727, p. 403-11, 1983.

KOERICH, L. et al. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective trypomastigote forms in vitro. **Parasitology**, v. 88, p. 21-25, 2002.

LARANJA, F. S. et al. Chagas' disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. **Circulation**, v. 14, p. 1035-1060, 1956.

MANGRICH, I.E. et al. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. **Parasitol. Res.**, v. 87, p. 505-509, 2001.

MEDRANO-MERCADO, N. et al. Acute-phase proteins and serologic profiles of chagasic children from an endemic area in Bolivia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, p. 154, 1996.

MILES, M. A. et al. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, n. 6, p. 1251-1259, 1983.

MINEO, J. R. et al. Total and specific anti- *Trypanosoma cruzi* immunoglobulin E in pericardial fluid samples from patients with chronic Chagas' disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, p. 578, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Definições de Unidades Hemoterápicas. **Ministério da saúde**. Bol Epidemiol, 1(3): 1-39, 1993.

MIRANDA SANTOS, I. K. F. & PEREIRA, M. E. A. Lectins discriminate between pathogenic and nonpathogenic South American trypanosomes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 33, p. 839-44, 1984.

MORGAN, J. et al. Analysis of anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype specificities by western blot in sera from patients with different forms of Chagas' disease. **J. Parasitol.**, v. 84, p. 641, 1998.

MORGAN, J. et al. Anti- *Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 355, 1996.

MURTHY, V. K.; DIBBERN, K. M.; CAMPBELL, D. A. PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. **Mol. Cell Probes**, v. 6, p. 237-243, 1992.

ROSS, A. & NOVOA – MONTERO, D. Comparability and reability of ELISA, immunofluorescence and indirect hemmagglutination assays for *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **J. Infec. Diseases**, v. 168, p. 1581-1584, 1983.

SALDAÑA, A. et al. *Trypanosoma rangeli*: Identification and purification of a 48 – KDA – specific antigen. **J. Parasitol.**, v. 84, n. 1, p. 67-73, 1997.

SALDAÑA, A. et al. Evaluacion de cuatro metodos inmunobioquimico/moleculares en la identificacion de cepas de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*. **Revista Médica de Panamá**, v. 18, n. 1, p. 41-52, 1993.

SALDAÑA, A. et al. *Trypanosoma rangeli* sialidase: kinetics of release and antigenic characterization. **Acta Tropica**, v. 70, p. 87-99, 1998.

SALDAÑA, A. Immunobiochemical significance of *Trypanosoma rangeli* in the study of *Trypanosoma cruzi*. **From the Microbiology and Tumorbiology Center (MTC)**,

Karolinska Institute, Stockoholm, Sweden and the Center for Research and Diagnosis of Parasitic Diseases (CIDEP), Faculty of Medicine, University of Panama, p. 7-51, 1997.

SALDAÑA, A.; SOUSA, O. E.; ÖRN, A . Immunoparasitological studies of *Trypanosoma cruzi* low virulence clones from Panama: humoral immune responses and antigenic cross-reactions with *Trypanosoma rangeli* in experimentally infected mice. **Scand. J. Immunol.**, v. 42, p. 644-650, 1995.

SALDAÑA, A.; SOUSA, O.E. *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*: cross-reaction among their immunogenic components. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 81-82, 1996 a.

SALDAÑA, A.; SOUSA, O.E. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. **J. Parasitol.**, v. 82, n. 2, p. 363-366, 1996 b.

SCHOTTELIUS, J. Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* by their different complement sensitivity. **Trop. Parasitol.**, v. 33, p. 147-150, 1982.

SCHOTTELIUS, J. Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the basis of their sialic acid content. **Tropenmed. Parasitol.**, v. 33, p. 160-62, 1984.

SCHOTTELIUS, J. & MÜLLER, V. Interspecific differentiation of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma conorhini* and *Trypanosoma rangeli* by lectins in combination with complement lysis. **Acta Tropica**, v. 41, p. 29-38, 1984.

SILVA, A.M. Riscos de Transmissão da Doença de Chagas por transfusão Sanguínea no Estado de Santa Catarina, Brasil, Tese de Doutorado, São Paulo, USP, 2002.

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas. **Rev. Soc. Brasil Med. Trop.**, v. 29, n. 3, p. 5-28, 1994.

SILVEIRA, J. F.; UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A. O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 6, p. 286-291, 2001.

SOUSA, O. E. & JOHNSON, C. M. Frequency and distribution of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in the Republic of Panamá. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 20. n. 3, p. 405-410, 1971.

SOUTO, R.P.; VARGAS, N.; ZINGALES, B. *Trypanosoma rangeli*: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. **Experimental Parasitology**, v. 91, p. 306-314, 1999.

STEINDEL, M. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* isoladas de reservatórios e vetores naturalmente infectados de Santa Catarina, Tese de Doutorado, Belo Horizonte, UFMG, 1993.

STEINDEL, M. et al. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echymys dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 73-79, 1991.

SULLIVAN, J. J. et al. Trypanosomes and microfilariae in feral owl and squirrel monkeys maintained in research colonies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 49, p. 254-259, 1993.

TOBIE, E. J. Increased infectivity of a cyclically maintained strain of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus*. **J. Parasitol.**, v. 51, n. 5, p. 837-841, 1964.

TOVAR, D.; URDANETA – MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*, Tejera, 1920, study of the effects of the parasite on the vector. **Acta Cient. Venez.**, v. 40, p. 208-214, 1989.

UMEZAWA, E. S.; SHIKANAI – YASUDA, M. A.; STOLF, A. M. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas' disease. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 10, p. 407, 1996.

VALLEJO, G. A. et al. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polimerase chain amplification of kinetoplast minicircle DNA. **Acta Tropica**, v. 72, n. 2, p. 203-212, 1999.

VARGAS, N. et al. Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potencial application in epidemiological investigations. **Exp. Parasitol.**, v. 96, p. 147-159, 2000.

VÁSQUEZ, J. E. et al. Serological diagnosis of *Trypanosoma rangeli* infected patients. A comparison of different methods and its implications for the diagnosis of Chagas' disease. **Scand. Immunol.**, v. 45, p. 322-330, 1997.

WOODY, N. C. et al. American trypanosomiasis (Chagas' disease): first indigenous case in the United States. **JAMA**, v. 159, p. 676-677, 1955.

YVES, C. , MD, MSC. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). **Medicine Journal**, v. 3, n. 3, p. 1-22, 2002.

ZICKER, F. et al. Benefícios previdenciários por incapacidade como indicador de morbidade: estudo da doença de Chagas em Goiás. **Rev. Goiana Med.**, v. 31, p. 125-136, 1985.