

ELAINE CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA

***RESPOSTA IMUNE AUTOREATIVA AOS COMPONENTES DA
MIELINA EM PACIENTES PORTADORES DA FORMA
GASTRINTESTINAL DA DOENÇA DE CHAGAS***

**CAMPINAS
2004**

ELAINE CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA

**RESPOSTA IMUNE AUTOREATIVA AOS COMPONENTES DA
MIELINA EM PACIENTES PORTADORES DA FORMA
GASTRINTENTINAL DA DOENÇA DE CHAGAS**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de Doutor em Clínica
Médica, área de Ciências Básicas.*

ORIENTADORA: Profa. Dra. LEONILDA M. B. SANTOS

**CAMPINAS
2004**

UNIDADE 13c
CHAMADA UNICAMP
044
EX
CÓDIGO 64805
16.12.00086.05
PREÇO 11.00
DATA 20/07/05
CPD

Bibid 358817

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Ol 4r

Oliveira. Elaine Conceição de

Resposta imune autoreativa aos componentes da mielina em
pacientes portadores da forma gastrointestinal da doença de chagas /
Elaine Conceição de Oliveira. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Leonilda Maria Barbosa Santos

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

I. *Trypanossoma cruzi*. 2. Antígenos parasitários. 3. Doença de
chagas. 4. Autoimune. I. Santos, Leonilda Maria Barbosa. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

(Slb/fcm)

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador(a): *Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa Santos*

Membros:

1. Profa. Dra. Luciana de Deus Vicira de Moraes

2. Prof. Dr. Marcos Garcia Costa

3. Prof. Dr. Jamiro da Silva Wanderley

4. Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 23/06/2004

Trabalho realizado com apoio recebido da

CAPES E FAPESP

Epígrafe

“...Quem nos separará do amor de Cristo? Será tribulação, ou angústia, ou perseguição, ou fome, ou nudez, ou perigo, ou espada?

Como está escrito: Por amor de ti, somos entregues a morte o dia todo, fomos considerados como ovelhas para o matadouro.

Em todas estas coisas, porém, somos mais que vencedores, por meio daquele que nos amou.

Porque eu estou bem certo de que nem a morte, nem a vida, nem os anjos, nem os principados, nem as coisas do presente, nem do porvir, nem os poderes, nem a altura, nem a profundidade, nem qualquer criatura poderá separar-nos do amor de Deus, que está em Cristo Jesus, nosso Senhor.

Romanos 8: 35-39

Para a minha Família

A minha mãe Marilene dos Santos Sampaio, alicerce e grande exemplo para minha família. Onde todos nós buscamos conselho, força e amparo. E que principalmente não deixa de orar por mim nem um dia sequer.

Ao meu pai Laércio de Oliveira e irmãos José Laércio de Oliveira e Jorge Luís de Oliveira “in memoriam”: agradeço a Deus por vocês terem feito parte da minha vida”.

Para as minhas “mais que irmãs” Angela, Neusa e Rose. Apoio incondicional e irrestrito em todo o tempo. Sinto-me imensamente privilegiada por ter uma família como esta.

Aos sobrinhos, presentes de Deus na vida de toda a família: Leonardo Vinícios de Oliveira, José Laércio C. de Oliveira e Jorge Luis de Oliveira Jr.

A minha linda tia-avó Luisa (Tia Lô) por ficar esperando por mim todos os dias

Á minha Orientadora

PhD Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Ser orientador é ser mãe e pai, deve ser difícil aprender a “educar” filhos tão diferentes uns dos outros.

Só posso te dizer obrigado por tudo, pelas vezes que pudemos sorrir e chorar. A minha mãe diz que a gratidão é uma das maiores virtudes, e eu lhe sou grata por tudo que me ensinou.

GRUPO ALVO

Á minha segunda família, onde tenho crescido e aprendido a amar a Deus sobre todas as coisas. Foi aqui que aprendi o sentido da verdadeira amizade.

Aos amigos

Marcelo, Shirlei e Júlia Rhame, Ariana, Desirré, Klebber, Priscila, Natália, Janete, Ricardo, Luis Neto, Diego, Pedro, Amanda, José Eduardo, Antonio, Daniela e Camila Domingues, Lucilene Toffoli, Camila Camilo, Ana Carolina, Camila Pimentel, Vitor Francisco, Vitor Bianchini, Geraldo, Carina Oliveira, Gustavinho, Priscila Escabelo, Gabriel, Guilherme, Diogo e Ana Paula Meireles; Roberto e Lucilene Tin; Ary, Mônica e Vitor Weltmayer; Ibere e Marisa Meireles; Vanderley e Elaine Michelatto; Clênio e Adriana Carvalho; Wilson e Wilma Brandão; Eduardo e Ana Carolina Ojeda; Flávio e Dulce Barboni; Flávio e Silvana Zanotti; Pedro e Vânia Zimmer; João e Rose Tin.

Obrigado por orarem por mim!

*A minha grande amiga e irmã
Dannie Eiko Maeda Hallal Longo, por
se interessar pelo meu trabalho e me
ajudar tanto.*

*Aos meus grandes amigos: Alexandre,
Blanca, Marcelo, Juliana, Flávia,
Gislaine, Paula, Silvia, José Roberto.
Obrigado por serem meus amigos!*

*Um agradecimento especial para Célia
Aparecida Almeida Chaves Garcia e
sua família (David, Leonardo e Laura),
pela amizade e por todo apoio nos
momentos mais difíceis.*

*Ao professor e amigo Dr Paulo Maria
Ferreira de Araújo, pelos
ensinamentos e apoio que me foram
dados nesta caminhada.*

Agradecimentos

- Aos amigos Alessandro, Fabiano, Carlos Otávio, Sandra, Patrícia e Camila.
- Um super obrigado a Dirce minha “Mentora Celular”, pode parecer impossível, mas de tudo ela sabe um pouco.
- Ao Prof Dr Nelson Andreolo, chefe do ambulatório de Gastrocirurgia do HC-UNICAMP.
- Ao Prof Dr Francesco Langone, livre docente do Depto de Fisiologia- IB- UNICAMP.
- Ao Prof Dr Mario José Abdala Saad responsável pelo laboratório de Biologia Molecular- FCM- UNICAMP.
- Ao corpo de enfermagem do ambulatório de gastrocirurgia: a enfermeira Luciana e suas auxiliares (Sueli, Ângela, Sônia, Diva); e ao secretário Sidney.
- Aos funcionários do Departamento de Micro e Imuno:
 - Rose, Marcos César e Antônio (Biotério)
 - Lúcia e Lourdes (secretárias)
 - Daniele e Márcia (CEMIB)
 - José Raimundo (Biólogo do laboratório 5)
- Aos alunos e amigos: Letícia Chaves, Maria Eleonora (Nono), Patrícia Simione e Luís Peroni.
- Para Renata, secretária da Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas, pela amizade sincera e apoio nestes anos de doutorado.
- Para o Eduardo, secretário da Pós-Graduação da Clínica Médica, pelo apoio e colaboração.

- Aos funcionários do laboratório de Biologia Molecular, em especial para o Biólogo Luis Jianelli.
- As amigas Inara e Renata que me ensinaram as técnicas em biologia molecular.
- Para Irene Luciano Correia e Paulo Henrique de Oliveira secretários da Medicina Interna (GEDOCH).
- Para amiga e Profa Eneida de Paula, pelo carinho e amizade que sempre demonstrou por mim.
- A todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram da realização e conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	<i>PÁG.</i>
<i>RESUMO</i>	xiv
<i>ABSTRACT</i>	xvi
<i>1. INTRODUÇÃO</i>	18
<i>2. OBJETIVO</i>	40
<i>3. MATERIAIS E MÉTODOS</i>	42
<i>4. RESULTADOS</i>	49
<i>5. DISCUSSÃO</i>	58
<i>6. CONCLUSÃO</i>	66
<i>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	68
<i>8. APÊNDICE</i>	86
<i>I- Casuística</i>	
II- Trabalho Científico: NEUROPATHY OF GASTROINTESTINAL CHAGAS' DISEASE: AUTOREACTIVE RESPONSE TO MYELIN ANTIGENS ...	

LISTA DE ABREVIATURAS

MBP	Proteína Básica de Mielina
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
PHA	Fitohemaglutinina
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TCR	Receptor de célula T para o antígeno
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TCSE	Extrato solúvel de <i>T. cruzi</i>
Síndrome dos “Megás”	Megaesôfago e Megacólon

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, acredita-se que a intensa resposta linfoproliferativa observada na fase aguda da doença é responsável pelo aparecimento de clones de linfócitos auto-reativos, na fase crônica. Vários estudos têm demonstrado a reação cruzada entre os antígenos derivados do parasita e os componentes do hospedeiro. Estes estudos são mais freqüentes nos modelos experimentais ou em pacientes portadores de cardiomiopatias. Pouco se conhece, no entanto, sobre a resposta auto-imune dirigida contra o sistema nervoso periférico, que pode resultar clinicamente, nas manifestações gastrintestinais da doença de Chagas (síndrome dos *mega*).

No presente estudo demonstramos a presença de linfócitos auto-reativos e auto-anticorpos contra componentes do sistema nervoso periférico, no sangue de pacientes com síndrome dos *Mega*, decorrente da doença de Chagas. Conseguimos identificar uma região da molécula de MBP, seqüência de 1-30, sugerindo que a proteína básica de mielina seria o alvo da resposta imune dirigida contra o sistema nervoso periférico nestes pacientes.

ABSTRACT

ABSTRACT

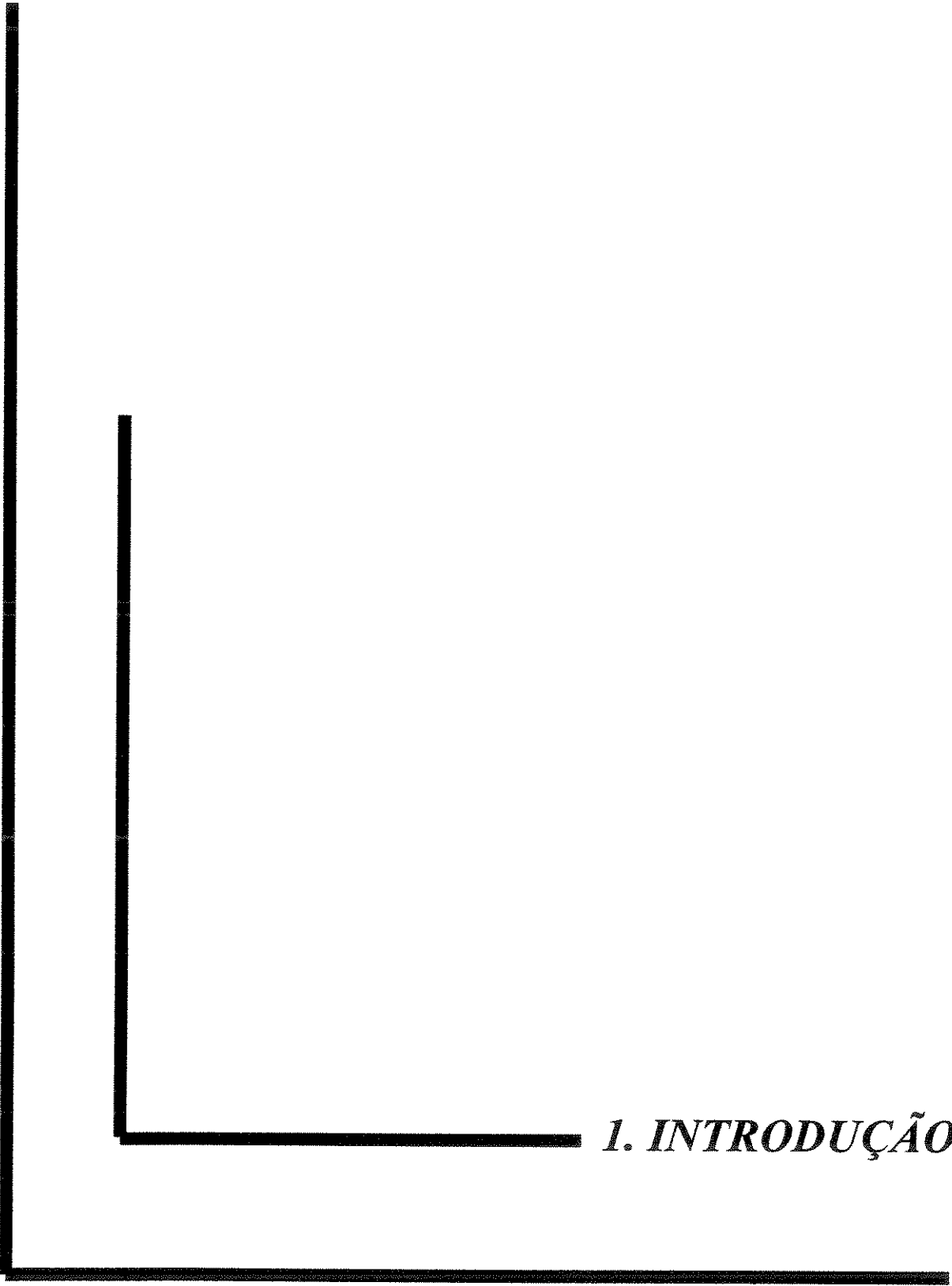
Most reports of autoimmune response during infection with the parasite *Trypanosoma cruzi* have dealt with the cardiomyopathic form of Chagas' disease, but there is another, less common, gastrointestinal form, which is studied here. Chronically infected patients with a severe gastrointestinal form of Chagas' disease present increased antibody production and proliferative responses to peripheral myelin components, such as myelin basic protein and peripheral nerve structures. T lymphocytes preferentially recognize a region on the myelin basic protein (MBP) molecule (1-30), which suggests that the MBP is a potential target on the peripheral nerve for autoimmune reactions in patients with gastrointestinal lesions resulting from Chagas' disease.

SUMÁRIO

	<i>PÁG.</i>
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVO.....	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4. RESULTADOS.....	49
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÃO.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
8. APÊNDICE	86
I- Casuística.....	
II- Trabalho Científico: NEUROPATHY OF GASTROINTESTINAL CHAGAS' DISEASE: AUTOREACTIVE RESPONSE TO MYELIN ANTIGENS ...	

SUMÁRIO

	<i>PÁG.</i>
<i>RESUMO</i>	xiv
<i>ABSTRACT</i>	xvi
<i>1. INTRODUÇÃO</i>	18
<i>2. OBJETIVO</i>	40
<i>3. MATERIAIS E MÉTODOS</i>	42
<i>4. RESULTADOS</i>	49
<i>5. DISCUSSÃO</i>	58
<i>6. CONCLUSÃO</i>	66
<i>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	68
<i>8. APÊNDICE</i>	86
<i>I- Casuística</i>	
<i>II- Trabalho Científico: NEUROPATHY OF GASTROINTESTINAL CHAGAS' DISEASE: AUTOREACTIVE RESPONSE TO MYELIN ANTIGENS ...</i>	



1. INTRODUÇÃO

ao intestino médio onde ocorre a multiplicação e finalmente atingem o reto diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicos, que são eliminados com as dejeções do inseto durante o repasto (BRENER, 1973; BURLEIGH e ANDREWS, 1995).

Diversos experimentos foram realizados a fim de se caracterizar biologicamente cepas do *T. cruzi*. Utilizando-se modelos experimentais, diferentes cepas puderam ser isoladas e expandidas em cultura (SOUSA, 1985). Assim, as características morfológicas das formas sanguíneas, o comportamento do parasita quanto à interação com células e tecidos do hospedeiro, o aspecto das diferentes formas da doença em diferentes hospedeiros e a resposta imune puderam ser investigados (BRENER, 1985). Desta forma, observou-se que camundongos infectados com as cepas *Y* e *CL* apresentavam diferentes curvas de parasitemia, sendo que a cepa *Y* invade os macrófagos mais rapidamente e se mostra mais agressiva que a cepa *CL* (MEIRELLES et al., 1992). Estudos também demonstraram que determinadas cepas apresentam tropismo, para determinados órgãos como o baço, fígado e tecidos como o miocárdio e o nervoso (MELO e BRENER, 1978). A virulência e a patogenicidade observados em determinadas cepas do *T. cruzi* são fatores determinantes para a gravidade e manifestação da doença (ANDRADE, 1985).

PRATA (1985) estudando pacientes em diferentes regiões brasileiras e países da América Latina observou que a manifestação das diferentes formas clínicas da doença variava em relação às áreas geográficas. A infecção pela mesma cepa induzia predominantemente a forma cardíaca em alguns lugares e a forma digestiva em outros.

A doença de Chagas é também um mal social, por isso mesmo a prevenção consiste no saneamento básico, no combate ao agente transmissor e na melhoria das

condições de habitação, já que o inseto costuma se abrigar nas frestas de paredes de barro ou madeira, típicas de regiões rurais e favelas.

Dentre as vias de transmissão da doença de Chagas humana, a mais importante é a vetorial (80 a 90%), segue a transfusão sanguínea (8 a 18%) e a menos expressiva é a congênita (0,5 a 2%), sendo a vetorial, a forma mais comum e também a mais preocupante. São conhecidas 118 espécies de triatomíneos, ou barbeiros, das quais 42 foram identificadas no Brasil, sendo 30 capturadas em domicílios. A transmissão vetorial acontece pelo contato do homem com as excretas contaminadas do inseto vetor (DIAS, 1987). A entrada do *T. cruzi* no organismo se dá após o inseto vetor sugar o sangue do hospedeiro; o inseto tem por hábito eliminar suas fezes enquanto se alimenta, contendo nelas a forma infectante do parasita, o tripomastigota metacíclico. A substância anestésica presente na saliva do inseto, utilizada para perfurar a pele da vítima, produz irritação e coceira, levando as fezes para dentro do ferimento; o tripomastigota entra rapidamente na corrente sanguínea infectando células residentes (REED, 1998).

A contaminação de indivíduos através de transfusão sanguínea é responsável pela maior quantidade de casos da doença de Chagas, depois da via vetorial. Este aumento significativo a partir dos anos 40 se deve à migração de indivíduos infectados da área rural para as grandes cidades, ampliando o risco de chagásicos assintomáticos serem doadores de sangue (DIAS, 1987). Nos anos 70 poucos serviços de hemoterapia realizavam triagem sorológica de doadores para *T. cruzi*, e estimava-se um aumento de 20.000 casos novos de doença de Chagas por ano. Neste sentido, mecanismos e estratégias para triagem de candidatos a doadores de sangue passaram a ser implementados, como os testes sorológicos,

que assumem papel de grande relevância na prevenção da doença de Chagas pós-transfusional (FERREIRA *et al.*, 1991).

A transmissão do *T. cruzi*, pela via transplacentária é a terceira entre as mais importantes, onde entre 1,6 e 8% dos filhos de mães com sorologia positiva nascem infectados (DIAS, 1987). A prevalência de gestantes infectadas no Brasil corresponde à cerca de 0,1 a 2% de mulheres de classe social média/baixa.

A doença de Chagas, por sua evolução crônica com diferentes perfis de morbimortalidade nas formas cardíaca e digestiva, tem elevado impacto econômico devido a gastos decorrentes de internação, absenteísmo, licença saúde e óbitos precoces (MILES *et al.*, 2003). Considerou-se no Brasil, que apenas o custo da implantação de marcapassos e cirurgias por megavíceras atinge a soma de alguns milhões anualmente. Com o sucesso no programa de controle da transmissão vetorial (SILVEIRA, 2000), e com a melhoria nas técnicas de diagnóstico e da qualidade do sangue, visando à interrupção da transmissão transfusional ou através de transplante de órgãos, o problema de novos casos de doença de Chagas na América Latina diminuiu sensivelmente. A Organização Mundial de Saúde visa erradicar a doença de Chagas até 2010, mas ainda temos muitos indivíduos infectados, que necessitam de tratamento. Porém a erradicação definitiva da tripanossomíase americana é praticamente impossível devido à alta complexidade dos ecótipos silvestres e da constante invasão do homem nos reservatórios silvestres.

Independente da via de transmissão do *T. cruzi*, no hospedeiro vertebrado o tripomastigota tem necessariamente que penetrar em uma célula, a fim de cumprir o seu ciclo evolutivo. Embora qualquer célula possa ser parasitada, o *T. cruzi* mais freqüentemente parasita macrófagos, células acessórias dos órgãos linfóides e fibroblastos,

microglia, células de Schwann e células musculares estriadas e lisas (BURLEIGH e WOOLSEY, 2002). Após a penetração na célula hospedeira, o tripomastigota se diferencia em amastigota, e depois de um período de latência de 20 a 30 horas, tem início o seu processo de divisão intracelular, o qual ocorre a cada 12 horas (NOGUEIRA et al., 1996). A célula parasitada rompe-se e libera as formas tripomastigotas que cairão na corrente sanguínea, disseminando-se para penetrar em outras células e tecidos, repetindo o ciclo (BURLEIGH e ANDREWS, 1995). Este aumento exponencial do número de parasitas pode levar a morte do hospedeiro ou, como ocorre na maioria dos pacientes, tem início uma resposta imune que controla gradativamente a proliferação parasitária.

Múltiplos fatores ligados ao *T. cruzi* são responsáveis pela forma que a doença de Chagas será desenvolvida como o tipo de cepa, virulência e tamanho do inoculo (BRENER, 1985). Diferentes cepas possuem comportamentos diversos, no que se refere à curva de parasitemia, interação com células hospedeiras e resposta imune. No homem, fatores como a idade, sexo, raça, fatores genéticos e ambientais podem influenciar o desenvolvimento da doença (BUSCAGLIA e DI NOIA, 2003; DEVERA et al., 2003).

1.2- Resposta do Hospedeiro à Infecção pelo *T. cruzi*

A doença de Chagas é caracterizada por uma fase aguda que dura cerca de dois meses, seguida de uma fase crônica que se prolonga por toda a vida do hospedeiro. A fase aguda pode ser aparente (observada principalmente em crianças com baixa idade) ou inaparente (acontece em indivíduos de todas as idades, freqüentemente apresentando somente um quadro febril). É caracterizada por intensa parasitemia, chagoma (lesão na porta de entrada do parasita), pela presença de parasitas circulantes, febre, esplenomegalia

resultando em uma reação inflamatória intensa com importante resposta proliferativa tanto de linfócitos B, como T, e uma variedade de outros sintomas, que pode incluir miocardite e envolvimento do sistema nervoso central (SNC), em alguns casos podendo ser fatal (COURA e CASTRO, 2002). Nesta fase da doença predominam, durante o processo inflamatório, os fenômenos vasculares, exsudativos e degenerativos necróticos, aos quais se associa o parasitismo tecidual, em geral intenso (CHAPADEIRO, 1999).

Com frequência, a fase aguda passa despercebida, pois seus sintomas podem confundir-se com os de diversas outras infecções. Entretanto, em alguns pacientes, principalmente crianças ou indivíduos imunodeficientes, quadros meníngeos graves e de insuficiência cardíaca podem estar associados e ocorrer óbito (ANDRADE et al., 1995).

Em muitos casos, o parasita pode ser detectado através da cultura de sangue em laboratório, ou mesmo através do xenodiagnóstico. Neste exame, insetos vetores não infectados são levados a picar um indivíduo com suspeita da doença. Após 30 dias o intestino destes insetos é analisado e o resultado será positivo no caso de se encontrarem parasitas vivos (PORTELA-LINDOSO e SHICANAI-YASUDA, 2003). A pesquisa de anticorpos séricos contra componentes do *T. cruzi* representa importante contribuição para o diagnóstico da doença, e também para a triagem de possíveis doadores de sangue (FERREIRA et al., 1991).

Ao final da fase aguda, segue-se uma fase clínica conhecida como “indeterminada” ou “assintomática”. Mais da metade das pessoas acometidas pela doença de Chagas permanecem pelo resto da vida com a forma indeterminada, assintomática ou latente da doença. O termo refere-se ao estado de indivíduos, comprovadamente infectados pelo agente etiológico, nos quais não são detectadas anormalidades clínicas imputáveis à

doença de Chagas, mas isto não quer dizer que com o decorrer do tempo estes pacientes não possam progredir para as formas determinadas da doença (DE OLIVEIRA JUNIOR, 1990; MARIN-NETO et al., 2002).

Se apesar da atuação do sistema imune com o objetivo de eliminar o parasita não for suficiente e a causa da injúria inicial não for totalmente eliminada, a inflamação aguda vai gradualmente dando lugar à inflamação crônica. A principal causa deste tipo de inflamação é a persistência do fator etiológico, seja o agente infeccioso ou restos provenientes da resposta (células, microorganismos, produtos do metabolismo, etc...).

A fase crônica é caracterizada por baixa parasitemia, não se observa parasitas circulantes, febre ou esplenomegalia, mas alguns indivíduos podem apresentar dano tissular progressivo, envolvendo principalmente o coração, esôfago, cólon (Mega-Síndrome) e sistema nervoso (HUDSON, 1985). Após vinte e trinta anos, 10 a 40% dos indivíduos infectados desenvolvem a fase crônica, sintomática, que tem sido classicamente dividida nas formas: cardíaca (mais grave); digestiva, representada pelo megaesôfago e megacólon e a forma mista, onde o paciente tem associação da forma cardíaca e digestiva.

A cardiopatia chagásica crônica (CCC) é a principal manifestação e a mais importante forma de limitação ao doente chagásico e a principal causa de morte. Ocorre cinco a trinta anos após a infecção primária em 30% dos pacientes crônicos (ZHANG e TARTELON, 1999). Pode apresentar-se sem sintomatologia, mas com alterações eletrocardiografias (principalmente bloqueio completo de ramo direito), como uma síndrome de insuficiência cardíaca progressiva, insuficiência cardíaca fulminante, ou com arritmias graves e morte súbita (PRATA, 1985; PRATA, 1990). A inflamação observada comumente na cardiopatia chagásica leva a destruição progressiva do tecido cardíaco,

levando a alterações na condução dos impulsos elétricos no coração e arritmias (TANOWITZ, 1992; ENGMAN e LEON, 2002). Os aumentos de volume e peso do coração são observados em quase todos os portadores de CCC. A dilatação das cavidades do coração contribui para a cardiomegalia e conseqüente dificuldade em bombear o sangue, caracterizando insuficiência cardíaca nos pacientes chagásicos. Os sinais e sintomas são: palpitação, dispnéia, edema, tosse, tonturas, desmaios entre outros sintomas mais graves. O Rx de tórax revela cardiomegalia global discreta, moderada ou acentuada, aumento isolado de ventrículo esquerdo, aumento biventricular e congestão vascular pulmonar (RASSI et al., 2000).

Estudos realizados através de análise histológica, para caracterização do infiltrado inflamatório observado em tecido cardíaco de pacientes com doença de Chagas crônica, revelou a presença de linfócitos, macrófagos, plasmócitos e leucócitos segmentados (REIS et al., 1993; CORREIA-OLIVEIRA et al., 1999). A análise do tecido mostrou fibrose intersticial difusa e miocitólise. Todos estes eventos ocorrem aparentemente sem a presença do parasita.

A esôfagopatia chagásica é uma síndrome caracterizada por uma dificuldade crônica de deglutição (disfagia crônica) devido a incoordenação motora do corpo esofágico em virtude de uma diminuição ou destruição dos plexos intramurais miontericos (plexo de Auerbach) o que acarreta hipertrofia e depois dilatação e aumento do comprimento desse órgão. A forma digestiva da doença de Chagas ou “Síndrome dos Mega” é caracterizado por alterações ao longo do trato digestivo ocasionadas por lesões dos plexos nervosos (destruição neuronal simpática), com conseqüentes alterações da motilidade e morfologia ao nível do trato digestivo, sendo o megaesôfago e o megacólon as manifestações mais comuns

(ADAD et al., 1991; LEMOS et al., 1998). São sinais e sintomas do megaesôfago: disfagia (sintoma mais freqüente e dominante), regurgitação, epigastralgia ou dor retroesternal, odinofagia (dor à deglutição), soluço, ptialismo (excesso de salivação), emagrecimento (podendo chegar à caquexia), hipertrofia das parótidas. Há quatro grupos de alterações que vão desde uma simples dificuldade de seu esvaziamento até ao dolicomegaesôfago, que corresponde àqueles com grande volume, alongado, atônico, dobrando-se sobre a cúpula diafragmática, produzindo sombra paracárdica direita ao simples exame de tórax.

O megacólon se caracteriza por: constipação intestinal (instalação lenta e insidiosa), meteorismo, distensão abdominal, fecaloma (DE OLIVEIRA et al., 1998). Os exames radiológicos são importantes no diagnóstico da forma digestiva. O megacólon é classificado em três grupos, de acordo com a imagem radiológica (REZENDE e MOREIRA, 1988; ADAD et al., 1991; LEMOS et al., 1998).

Ao contrário da fase aguda, onde as alterações patológicas são predominantemente decorrentes da ação direta do *T. cruzi* e da resposta imune do hospedeiro infectado, na fase crônica o agente etiológico desempenha papel bem menos relevante na patogênese da doença de Chagas.

1.3 - Resposta Imune contra o *T. cruzi*

Didaticamente a resposta imune pode ser dividida em duas partes: inata e adquirida. Na resposta imune em indivíduos imunocompetentes, inicialmente são observados mecanismos da resposta imune inata que se desenvolve nas duas primeiras semanas após a infecção: uma intensa resposta inflamatória se instala com o recrutamento de células e mediadores. Nos estágios intermediário e tardio da fase aguda uma resposta

imune específica se desenvolve, restando e controlando a parasitemia ascendente; a memória imunológica característica desta fase da resposta, é responsável pela manutenção do controle da parasitemia, garantindo resistência a reinfecção por toda a fase crônica da doença, responsável pelo controle do parasita pelo resto da vida do indivíduo (BACHMANN e KOPF, 2001).

Da resposta imune inata faz parte um conjunto de barreiras físicas (pele e mucosa) e químicas (diversas substâncias antimicrobicas), consideradas as primeiras linhas de defesa do organismo. Quando estas barreiras são quebradas, o organismo lança mão de diversos tipos celulares com a capacidade de destruir, impedir o aumento e disseminação de microorganismos. As primeiras células recrutadas são os neutrófilos (leucócitos segmentados) que têm a função específica de fagocitar e destruir microorganismos encontrados no sangue e nos tecidos; macrófagos que além de fagocitar têm a função de apresentar o antígeno aos linfócitos específicos, células Natural Killer (NK), as quais destroem células infectadas por vírus e células tumorais. A célula NK desempenha um papel importante na resposta imune inata aos microorganismos intracelulares, pois secreta citocinas como os interferons, que são potentes ativadores de macrófagos aumentando sua capacidade microbica. A citocina IFN γ tem um papel protetor inicial na infecção Chagásica (REED, 1988), presumivelmente devido à sua capacidade de ativar a produção de metabólitos do óxido nítrico (NO), com atividade tripanocida em macrófagos infectados (GAZZINELLI et al., 1992; MARTINS et al., 1999). A produção de citocinas como IL12 e IFN γ por mecanismos inatos de defesa favorecem a diferenciação de linfócitos T CD4 helper em linfócitos do tipo Th1, que estão relacionados com a resposta imune específica, observada na fase mais tardia da fase aguda. Em trabalho

realizado em nosso laboratório foi demonstrado que: camundongos tratados com antígenos do *T. cruzi* aumentam a resposta proliferativa e a produção de IFN γ , controlando assim a parasitemia (GARCIA et al, 2000).

Determinadas proteínas solúveis encontradas no plasma são conhecidas como Sistema Complemento, que atuam em cascata formando um complexo de ataque à membrana de microorganismos causando perfurações na mesma. Na resposta imune inata a via alternativa do complemento não exige especificidade, sendo de grande ajuda neste controle inicial.

Durante a resposta inflamatória ao *T. cruzi* uma das principais características da infecção tanto em humanos, quanto em modelo experimental, é a indução da ativação policlonal de linfócitos envolvendo células B e T. Um importante aspecto desta resposta é a preferencial ativação de células B CD5 e T $\gamma\delta$ (MINOPRIO, 2001).

A ativação policlonal de células B na fase aguda da doença leva a uma hipergamaglobulinemia poli-isotípica, sendo caracterizada por um aumento considerável de imunoglobulinas em resposta aos antígenos do parasita (ORTZ-ORTIZ, 1980). Reforçando esta idéia outros pesquisadores mostraram que além da ativação policlonal de linfócitos B havia o predomínio na produção de determinados isotipos de imunoglobulinas como IgG2a, IgG2b e IgM (D'IMPÉRIO LIMA et al., 1985). Pesquisas demonstraram que uma proteína de 33kDa (p33) extraída de epimastigotas ativariam a proliferação e o desenvolvimento de células B de camundongos normais em plasmócitos secretores de anticorpos *in vitro*. Foi observado também, que p33 induz preferencialmente a expressão de moléculas co-estimulatórias como B7. 2 e MHC de classe II na superfície de células B. Tudo isto acontece independentemente da ativação por linfócitos T (MONTES et al., 2002).

O estabelecimento da resposta imune após o indivíduo ser infectado pelo parasita intracelular *T. cruzi* não é imediato, pois através de mecanismos de escape o parasita tenta manter-se invisível ao sistema imunológico por um período maior ou até que muitas células sejam parasitadas, pois durante o primeiro período de multiplicação celular (primeiros três dias) não se observa infiltrado celular inflamatório.

A resposta imune inata terá início após quatro ou cinco dias à inoculação, quando aparecerão as primeiras células inflamatórias, como leucócitos polimorfonucleares, monócitos, linfócitos e a mobilização e ativação de macrófagos (principalmente, células dendríticas) em resposta as primeiras rupturas celulares decorrentes da multiplicação do parasita (BACHMANN e KOPF, 2001). O processo de invasão do parasita em macrófagos e células não fagocíticas é bastante complexo, envolvendo mecanismos e substâncias que favoreçam a entrada na célula e posterior multiplicação, tanto por parte do parasita quanto da célula alvo, bem como numerosos componentes na membrana de ambos (BURLEIGH e ANDREWS, 1995).

A resposta imune adquirida caracteriza-se pela presença de tipos celulares como linfócitos T CD4 e CD8, a produção de anticorpos e de citocinas específicas e memória imunológica. A característica que distingue os linfócitos das outras células do sistema imune é a propriedade de responder ao antígeno de forma específica. Os linfócitos T têm origem na medula óssea e sofrem maturação no timo, onde reorganizam os genes para um receptor específico (TCR), que reconhece o peptídeo antigênico associado às moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC).

No timo, após o rearranjo dos genes que codificam o complexo TCR, as células são submetidas a dois processos de seleção: seleção positiva, que garante que o repertório

de linfócitos T seja restrito ao MHC e a seleção negativa que elimina ou inativa clones potencialmente auto-reativos garantindo, desta forma, a maturação de células tolerantes aos componentes do organismo. Células potencialmente auto-reativas, no entanto, podem deixar o timo e circularem normalmente na periferia, onde, graças aos mecanismos de tolerância periférica, não causam maiores danos ao organismo, salvo nas situações onde a tolerância é quebrada e há o surgimento das doenças auto-imunes (VACCHIO e ASHWELL, 1994).

Vários mecanismos são responsáveis pela manutenção da tolerância periférica, entre os mais estudados podemos citar a, deleção de clones auto-reativos, anergia clonal ou a imunoregulação por produtos celulares, como as citocinas (VACCHIO e ASHWELL, 1994; YANG et al., 1995).

A deleção clonal, principalmente através da indução de apoptose, é o principal mecanismo de eliminação dos clones autoreativos no timo. O CD95 (FasL) é uma proteína transmembrana, expressa em muitos tecidos como o baço, timo, pulmão, ovários, coração e intestino delgado. O Fas (CD95) é uma proteína de membrana que constitutivamente é expressa na superfície de linfócitos T e B ativados, hepatócitos, e em vários outros tecidos e células tumorais. Após a interação destas moléculas, Fas-FasL, um sinal é gerado induzindo a morte celular programada (apoptose) (ALDERSON et al., 1995; MARTINS, et al., 1999). No entanto, estudos realizados em humanos e modelo experimental sugerem que as interações Fas-FasL estão envolvidos com a deleção de células T na periferia, com manutenção da tolerância aos antígenos próprios (ALMERIGOGNA, et al., 1996). Os mecanismos que levam à indução da morte celular programada ainda não estão bem conhecidos, mas sabe-se que altas doses do antígeno ou mesmo super-antígenos podem causar a eliminação de linfócitos maduros na periferia (LENARDO et al., 1999)

A possibilidade de existir outros mecanismos envolvidos em manter a tolerância periférica, além da deleção clonal foi considerada, uma vez que indivíduos sadios apresentavam células T e B que reconheciam os antígenos próprios. Na anergia clonal, observa-se que linfócitos T imunocompetentes, que conseguiram escapar à seleção negativa no timo, migram para a periferia, mas não respondem ao antígeno específico. Para a célula T ser ativada não é suficiente a ligação do TCR com o antígeno específico ligado às moléculas do MHC de classe I ou II, são necessários outros sinais co-estimulatórios provenientes da interação de moléculas acessórias da superfície dos linfócitos T que se ligam às outras complementares, localizadas nas células apresentadoras de antígeno.

Os receptores CD28/CTLA4 são glicoproteínas expressas na superfície de linfócitos T de humanos e de murinos, e sua função, entre outras, é estimular o contato das células T com as células apresentadoras de antígeno, desempenhando potencial para sinalização positiva e negativa na ativação dos linfócitos T (LENSCHOW *et al.*, 1996). As moléculas complementares B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) estão presentes nas células que desempenham a função de apresentar antígenos aos linfócitos T, assim como nas células B ativadas, células de Langherans, células dendríticas e macrófagos ativados. Estudos revelam que a expressão e regulação de B7-1 e B7-2 são dependentes de citocinas (LINSLEY e LEDBETTER, 1993). A interação destas moléculas CD28/CTLA-4 com B7-1 ou B7-2 significa o segundo sinal necessário para iniciar uma resposta imune (KHOURY *et al.*, 1995). A secreção de citocinas que eventualmente participarão da ativação linfocitária, normalmente ocorre após a ligação do antígeno-MHC e células T.

As células responsáveis pela especificidade da resposta imune são as células T CD4 ou CD8 que reconhecem especificamente os antígenos. O linfócito T CD4, após

reconhecer o antígeno, diferencia-se em sub-populações específicas, responsáveis pela efetividade da resposta causando a eliminação de microrganismos e a regulação da resposta imune.

MOSMANN e COFFMAN (1989) introduziram o conceito de Th1 e Th2 baseado nos diferentes tipos de citocinas produzidos após o reconhecimento do antígeno. Este conceito permitiu avanços no conhecimento dos diversos tipos de respostas frente a enorme variedade de microrganismos que freqüentemente o homem é exposto. O modelo de Th1 e Th2 para a diferenciação de linfócitos T CD4 propõe que após a ligação com antígeno, células T helper diferenciam-se em duas sub-populações, que são caracterizadas pelo padrão de citocinas secretadas. Os linfócitos CD4 Th1 secretam principalmente IL2, IFN γ e TNF β , ativam macrófagos e medeiam reações de hipersensibilidade do tipo tardio. Os linfócitos CD4 Th2 produzem IL4, IL5, IL10 e IL13, são importante na síntese de IgE e podem suprimir a resposta imune celular (ROMAGNANI, 1997). As citocinas produzidas por cada um dos subgrupos de linfócitos T atuam como seu próprio fator de crescimento, assim como podem regular negativamente o desenvolvimento e função do subtipo oposto. Este modelo de regulação cruzada tem sido utilizado, com sucesso, para explicar vários fenômenos imunológicos, principalmente a resposta imune a agentes infecciosos (SEDER e PAUL, 1994).

Em geral, as células do tipo Th1 têm sua melhor atuação, quando em resposta à parasitas intracelulares, enquanto que parasitas extracelulares atuam tanto Th1 como Th2. O conceito de Th1 e Th2 não só ajudou a compreensão dos mecanismos protetores da resposta imune como também permitiu explicar os mecanismos envolvidos em várias doenças (O'GARRA e MURPHY, 1996; ROMAGNANI, 1997).

A resposta imune adquirida, mediada por linfócitos T CD4 e CD8 e pelos anticorpos produzidos por linfócitos B, é absolutamente essencial para o controle da parasitemia e para a sobrevivência do hospedeiro. Trabalhos realizados em modelo experimental, mostra a importância das células T CD8, no controle da infecção pelo *T. cruzi*. A depleção destas células por anticorpos monoclonais leva a exacerbação da doença, devido ao aumento da parasitemia e mortalidade nos animais infectados (TARLETON, 1990; ROWLAND e CHEN, 2003). E também, os animais deficientes em células T CD4 e CD8 apresentam alta carga parasitária nos tecidos, mas pouca lesão tecidual. Estes dados sugerem que a lesão tecidual é consequência inescapável do processo do parasitismo tecidual por linfócitos efetores (TARLETON, 1999).

Em relação à gênese das lesões inflamatórias e celulares na fase crônica da doença de Chagas, vários parecem ser os mecanismos envolvidos. O que tem despertado a atenção são os mecanismos imunitários, em especial a resposta imune celular através da hipersensibilidade tardia e mecanismos auto-ímmes (BRENER, 1980). Os mecanismos patogênicos das lesões e a evolução para as diferentes formas anatomo-clínicas da doença de Chagas ainda não estão bem estabelecidos.

Como é característica de parasitas intracelulares, o *T. cruzi* é capaz de infectar o homem, resistindo ao ataque da resposta imune. No entanto, após a ativação policlonal generalizada e um período de imunossupressão, o hospedeiro torna-se capaz de controlar o nível de parasitismo nos tecidos. Apesar de ainda não estar completamente entendida, a hipótese mais aceita para explicar a miocardiopatia e as mega-síndromes observadas na fase crônica da doença de Chagas, assenta-se em mecanismos auto-ímmes e não na participação direta do parasita (KIERSZENBAUM, 1999). Tal fato, associado ao encontro raro de

parasitas em cortes histológicos de miocárdio e à baixa parasitemia em pacientes na fase crônica, reforçam a idéia da auto-imunidade estar diretamente envolvida na gênese destas doenças.

1.4- Autoimunidade na Doença de Chagas

Existem duas linhas de trabalho que objetivam entender os mecanismos responsáveis pelas lesões observadas na fase crônica da doença de Chagas. A primeira consiste na tendência atual, onde o controle imunológico da carga parasitária nos tecidos é que gera mecanismos de lesão tecidual progressiva (TARLETON, 2003). A segunda, no entanto, não descarta que mecanismos imunológicos de auto-reconhecimento, disparados pelo processo infeccioso também possam ter um papel adicional na patogênese destas mesmas lesões (RIBEIRO DOS SANTOS et al., 1992).

Recentemente, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem demonstrando elevada sensibilidade na detecção de DNA de *T. cruzi* em amostras de pacientes com doença de Chagas (SILVEIRA, 2002). Principalmente em biópsias de tecidos, ou nos sítios inflamatórios, encontrados em tecido cardíaco e no trato gastrintestinal, de pacientes crônicos da doença de Chagas. Alguns pesquisadores, ao examinar tecido obtido do esôfago de pacientes com Chagas, estabeleceram uma correlação entre o megaesôfago e a presença do *T. cruzi* (VAGO et al., 1996; LAGES-SILVA et al., 2001). Estas, entre outras observações sugerem que a patogênese observada na cardiopatia chagásica e na síndrome dos “Megs”, só acontece pela presença de DNA do parasita nestes tecidos (HIGUCHI et al., 1993; ZHANG e TARTELON, 1999).

Em contrapartida, a segunda linha de pensamento, acredita que os processos infecciosos e as reações auto-imunes estão intimamente relacionados (ROSE, 1998; FAIRWEATHER et al., 2001). Alguns autores associam esta relação ao mimetismo molecular. O conceito de mimetismo molecular explica que determinantes antigênicos de microorganismos infecciosos, similares às estruturas do tecido do hospedeiro geram uma resposta imune ao próprio (ROSE, 2001). A participação de agentes infecciosos na gênese de doenças auto-imunes tais como: Streptococos β -hemolítico e febre reumática; Coxsackievírus e miocardite; diversos vírus e Esclerose Múltipla; Citomegalovírus e Diabetes tipo 1 vêm sendo descrita há várias décadas e provavelmente as lesões observadas na doença de Chagas crônica, possam ser explicadas pelo mesmo mecanismo (BENOIST e MATHIS, 2001).

A doença de Chagas constitui um desafio para pesquisadores que estudam a reação cruzada entre epítomos do hospedeiro e do parasita. A descrição de reação cruzada entre proteínas ribossomais humanas e do *T. cruzi*, sugerem que a produção de anticorpos dirigidos contra o tecido cardíaco e nervoso pode ter sua indução através do mimetismo molecular (BONFA et al., 1993).

Nas últimas duas décadas, a literatura mostra evidências que sugerem a natureza auto-imune das reações observadas na fase crônica da Doença de Chagas (KALIL e CUNHA- NETO, 1996). Acredita-se que a intensa ativação policlonal, observada na fase aguda da doença, pode ser a origem dos clones auto-reativos descritos na fase crônica (D'IMPERIO-LIMA et al., 1985; GRAUERT et al, 1993).

Os mecanismos imunológicos de auto-agressão nas cardiomiopatias chagásicas estão sendo estudados, havendo uma certa concordância nos diferentes grupos quanto às

reações observadas. Vários pesquisadores descreveram a presença de auto-anticorpos contra componentes do tecido cardíaco, tanto em humanos, como no modelo experimental. A participação das células envolvidas nas reações de hipersensibilidade também foi descrita pelos autores. Exemplificando as reações de hipersensibilidade do tipo tardio em animais infectados, foi demonstrado que a infecção de camundongos com *T.cruzi* induz a expansão de clones de células T CD4 reativas ao tecido cardíaco, células estas que estão envolvidas na rejeição de implante de coração em animais singênicos (RIBEIRO dos SANTOS *et al.*, 1992). No sentido de identificar as estruturas antigênicas, contra as quais o organismo responde, RIZZO e colaboradores (1989) avaliaram a resposta linfoproliferativa de células T de animais cronicamente infectados com *T.cruzi*, em resposta a actina, miosina ou antígeno solúvel de *T.cruzi*, e foram capazes de demonstrar que as células T CD4 proliferam em resposta à miosina, mas não à actina.

Os auto-anticorpos contra estruturas antigênicas do coração também foram pesquisados: anticorpos contra dois antígenos identificados como proteínas contráteis da miosina (200 kDa) e uma proteína do filamento intermediário (53 kDa), observado no sangue de animais cronicamente infectados. Mais recentemente foi verificado a reação cruzada entre clones de linfócitos T de pacientes chagásicos com um epítipo derivado de *T.cruzi* (B 13) e a miosina (CUNHA-NETO *et al.*, 1996, ABEL *et al.*, 1997). Os autores foram capazes ainda, de mostrar que os clones de linfócitos derivados de biopsia cardíaca de pacientes chagásicos apresentam o padrão Th1, ou seja produzem preferencialmente citocinas com ação pró-inflamatória como IFN γ e TNF α (CUNHA-NETO *et al.*, 1998).

Em adição as cardiomiopatias presentes na fase crônica da Doença de Chagas, as lesões do trato gastrointestinal, as “megasíndromes”, embora menos estudadas, também levam danos tissulares onde os processos auto-ímmes podem estar envolvidos.

Aproximadamente 5% dos pacientes portadores de doença de Chagas apresentam as “Mega” condições. Estas lesões são caracterizadas pela diminuição dos neurônios dos plexos parassimpáticos, presença de importante infiltrado de células mononucleares e comprometimento da parede intestinal (D’AVILA et al., 2001). Vários graus de destruição neuronal foram associados à presença de infiltrado linfocitário tanto em humanos, como no modelo animal. Há mais de duas décadas os autores mostraram a seletiva afinidade e atividade citotóxica de linfócitos de animais infectados com *T.cruzi* dirigida contra os neurônios parassimpáticos (TEIXEIRA et al., 1980). Nessa mesma época, demonstrou-se que tanto os antígenos neuronais, como os derivados de *T.cruzi* podiam ser reconhecidos por um anticorpo monoclonal gerado contra neurônios periféricos (WOOD et al., 1982).

CHAPADEIRO e colaboradores (1999) utilizando hamsters como modelo experimental estudaram lesões, no plexo nervoso parassimpático dos órgãos ocos, especialmente do coração e do tubo digestivo, e observaram destruição neuronal e uma diminuição significativa de neurônios residentes durante a fase crônica da infecção chagásica. Anticorpos circulantes dirigidos aos componentes do sistema nervoso periférico (SNP), especialmente aqueles que reconhecem antígenos das células de Schwann nos dão ainda mais suportes para acreditar que as lesões observadas nas Mega síndromes são de natureza auto-ímmune (KHOURY et al., 1979).

Estudos posteriores mostraram reações de hipersensibilidade do tipo tardio, onde linfócitos T CD4, de animais cronicamente infectados com *T.cruzi*, foram identificados, mediando a desmielinização do nervo ciático (SAID *et al.*, 1985). Posteriormente, o mimetismo molecular entre antígenos derivados de *T.cruzi* e estruturas do Sistema nervoso foram demonstrado através da clonagem de genes para uma proteína de 160 kDa, associada à membrana do flagelo do *T.cruzi* (Fl-160), na forma tripomastigota (VAN VOORHIS e EISEN, 1989). Esse gene codifica uma proteína que mimetiza outra de 48 kDa encontrada somente nos tecidos do sistema nervoso (VAN VOORHIS *et al.*, 1991).

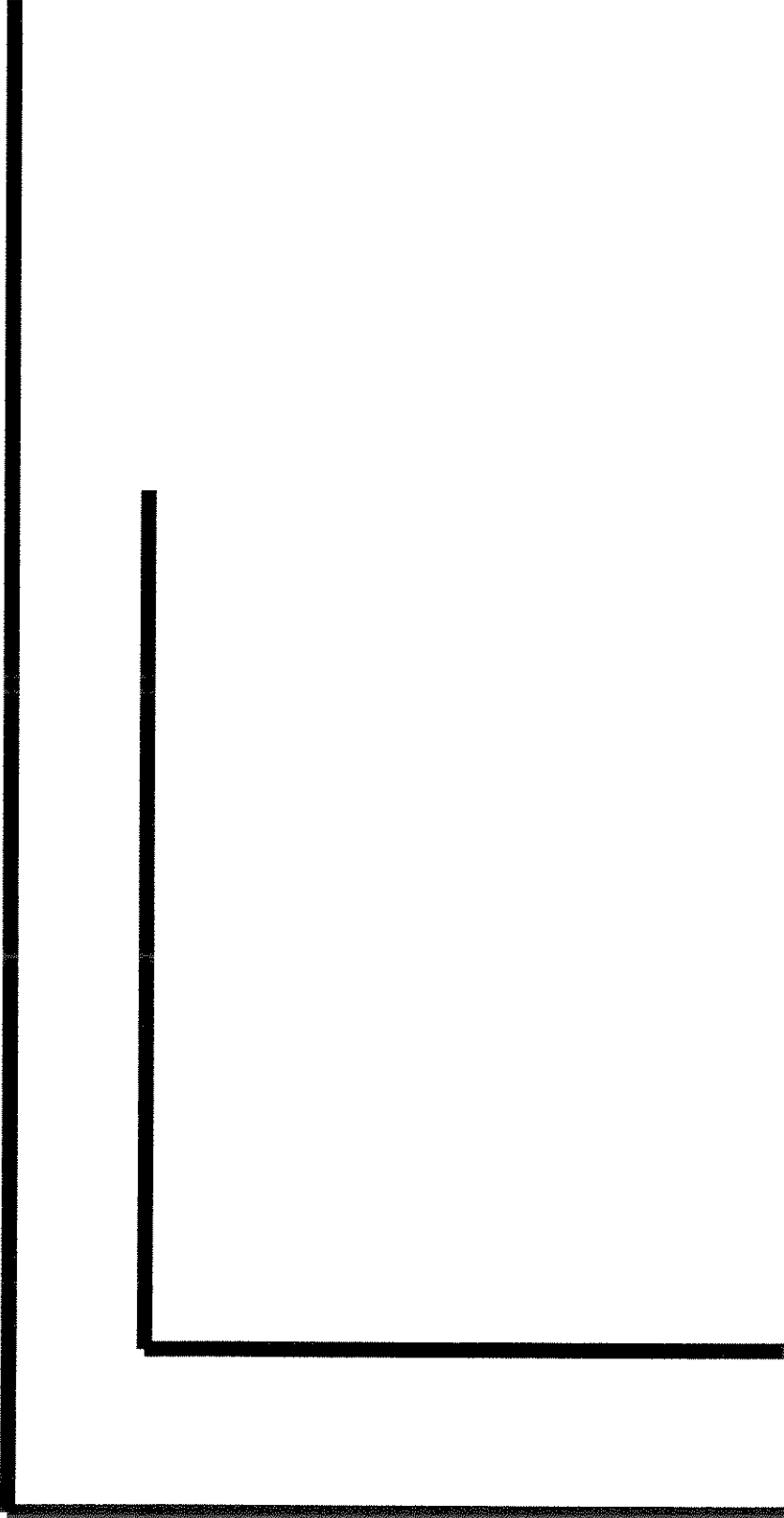
Embora as lesões do sistema nervoso periférico sejam as mais frequentes em indivíduos infectados com *T.cruzi*, existe a possibilidade de haver reação cruzada entre a mielina obtida do SNC e a periférica, uma vez que já foi demonstrada a reatividade cruzada entre os antígenos derivados de *T.cruzi* e estruturas do sistema nervoso central. Alguns determinantes em comum foram descritos para o cerebelo de camundongos e antígenos de *T.cruzi* (SNARY *et al.*, 1983).

A Proteína Básica de Mielina (MBP) constitui cerca de 30% da Mielina do SNC estando presente em pequena quantidade na Mielina do Sistema Nervoso Periférico (SNP). A mielina do SNP é formada de pelo menos três componentes: P0, P1 e P2. Os componentes P0 e P2 são exclusivos da mielina do SNP, enquanto P1 tem estrutura em comum aos dois sistemas, sendo praticamente idêntica à molécula de MBP. Esta semelhança molecular pode explicar porque clones de células T, específicos para MBP, podem causar inflamação e desmielinização periférica, quando os mesmos são transferidos a animais recipientes singenéticos (HEMACHUDHA *et al.*, 1987). Foi também demonstrado que clones de linfócitos específicos para o epítopo 151-168 da MBP, transferidos a animais

singenéticos induziram pouca inflamação quando se examinaram as lesões no SNC, no entanto, causaram significativa inflamação e desmielinização do sistema nervoso periférico (ABROMSON-LEEMAN et al., 1995).

Em trabalho realizado em nosso laboratório, foi mostrado que animais cronicamente infectados com *T. cruzi* produzem anticorpos e respondem, proliferando, à Proteína Básica de Mielina. Foi possível identificar dois epítomos da molécula de MBP (51-80) e (150-171) responsáveis pela reatividade cruzado com as células de animais cronicamente infectados com *T. cruzi* (AL-SABBAGH et al., 1998).

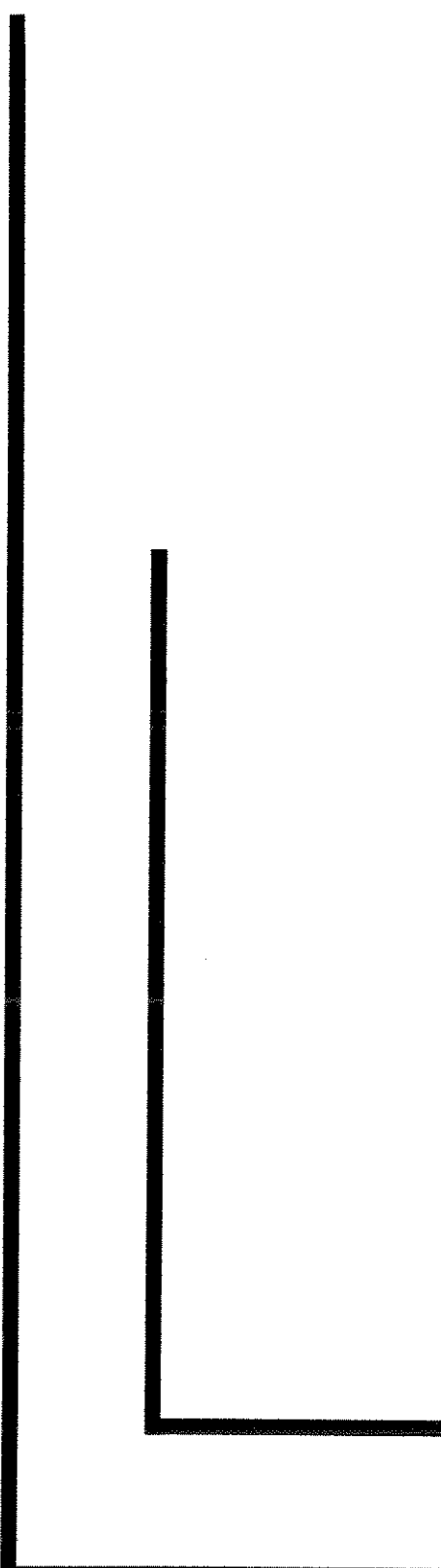
Diante destas evidências, o presente trabalho visa entender mecanismos imunológicos envolvidos na destruição de estruturas do sistema nervoso periférico, de pacientes portadores de Doença de Chagas, apresentando as manifestações gastrintestinais (síndrome dos *Mega*).



2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi:

Estudar a presença de anticorpos e linfócitos auto-reativos aos componentes da mielina do sistema nervoso central e periférico e extrato do *T. cruzi* no sangue de pacientes portadores da Síndrome dos *Mega*, decorrente da Doença de Chagas crônica.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

1- Pacientes: As amostras analisadas neste estudo foram obtidas de indivíduos provenientes de zonas endêmicas brasileiras. Os pacientes portadores de doença de Chagas foram atendidos pelo Grupo de Estudo em Doença de Chagas (GEDOCH) e no Ambulatório de Gastrocirurgia do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

Os pacientes portadores de doença de Chagas com megaesôfago e megacólon foram divididos em quatro grupos de acordo com alterações na contratibilidade e diâmetro do órgão observado através de exame radiológico. A classificação adotada foi descrita por Rezende et al. (1976) e compreende quatro grupos assim caracterizados:

- **Grupo I** - Esôfago de calibre aparentemente normal ao exame radiológico. Trânsito lento. Pequena retenção na radiografia tomada um minuto após a ingestão de sulfato de bário;
- **Grupo II** - Esôfago com pequeno a moderado aumento do calibre. Apreciável retenção de contraste. Presença freqüente de ondas terciárias, associadas ou não a hipertonia do esôfago;
- **Grupo III** - Esôfago com grande aumento de diâmetro. Atividade motora reduzida. Hipotonia do esôfago inferior. Grande retenção de contraste;
- **Grupo IV** - Dolicomegaesôfago. Esôfago com grande capacidade de retenção, atônico, alongado, dobrando-se sobre a cúpula diafragmática;

O diagnóstico radiológico da colopatia chagásica ou megacólon é baseado em um característico aumento do calibre do cólon sigmóide. No presente estudo os grupos estudados foram: 25 pacientes classificados nos grupos I e II; 43 pacientes classificados nos

grupos III e IV da doença de Chagas. Nos grupos controles foram estudados: 41 indivíduos com sorologia para Chagas negativa (N), 27 pacientes com sorologia para Chagas positiva, mas assintomáticos, classificados como forma indeterminada da doença (FI) e 26 indivíduos portadores de doença inflamatória do esôfago, refluxo gastro-esofágico (ER). As amostras foram coletadas mediante consentimento livre esclarecido de todos os indivíduos incluídos neste estudo.

2. ANTÍGENOS

2.1 – MBP Humana e Peptídeos: Proteína Básica de Mielina (MBP) purificada de cérebro humano, de acordo com o método de DEIBLER et al. 1972.

2.2 - Os peptídeos foram sintetizados por Genemed Synthesis, CA, USA. As seqüências são: MBP 1-20 (MASQKRPSQRHGSKYLATAST); 11-30 (HGSKYLATASTMDHARHGFL); 41-60 (NPSIGRFFGGDRGAPKRGSGKV); 111-130 (VVHFFKNIVTPRTPPPSQ); 121-140 (VTPRTPPPSQGKGRGLSLSR); 131-150 (GKGRGLSLSRFSWGAEGQRP).

2.2 –Obtenção de Mielina Humana do Sistema Nervoso Central e Periférico: Cérebro e nervo ciático humano foram obtidos no Departamento de Patologia Clínica e removido de pacientes que morreram de doenças que não comprometem o sistema nervoso e congelado em nitrogênio líquido. Foram estocados em freezer -70°C para posterior extração de neuroantígenos.

Mielina do SNC - A substância branca do cérebro foi removida e a mielina extraída através do gradiente de sucrose (solução de 0,32 M e 0,85 M). A mielina foi tratada em metanol e

clorofórmio, na proporção de 2:1 para retirada dos lipídeos, em seguida procedeu-se à filtração em filtro Whatman #1. Coletamos o material retido no papel filtro e lavamos três vezes com água duplamente purificada. A mielina delipídada foi liofilizada e os níveis protéicos foram quantificados através do método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Bio-Rad-USA).

Mielina do SNP - O nervo foi cortado em pequenas porções e macerado em nitrogênio líquido, pois o mesmo é constituído em grande parte por fibras e tecido conjuntivo, as quais dificultou-nos triturá-lo, pelos métodos convencionais (liquidificador ou Politron). O material em pó resultante foi tratado em metanol e clorofórmio, na proporção de 2:1 para retirada dos lipídeos, em seguida procedeu-se à filtração em filtro Whatman #1. Coletamos o material retido no papel filtro e lavamos três vezes com água duplamente purificada. Após as lavagens, o material foi ressuscitado em 2 volumes de água e sonificado por 30 minutos. Em seguida centrifugamos o material por 30 minutos, a 10.000 rpm, o sobrenadante foi liofilizado e estocado a -20°C. Os níveis protéicos foram quantificados através do método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Bio-Rad-USA).

2.4 - Antígeno do Parasita: A cepa do *T. cruzi* foi gentilmente cedida pela Profa Dra Fernanda Ramos Gadelha. O extrato solúvel do *T. cruzi* (TCSE) foi obtido segundo o protocolo de Corsini e colaboradores (1980). Foi utilizada a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. Parasitas em cultura (aproximadamente 3×10^9 epimastigotas) foram lavados 3 vezes com salina gelada, NaCl 0,15 M, e centrifugados a 1.400 g por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuscitado em 10 ml de água destilada, e imediatamente liofilizado. Alíquotas de 200 mg do material foram incubadas com 25 ml de solução de NaCl 0,15 M a 0°C por 10

minutos e a seguir, centrifugadas a 12.000 g por 30 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 10 ml de PBS pH 7,2 e incubado em banho-maria a 37°C por 1 hora, sendo centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi mantido a -20°C em alíquotas de 1 ml. Os níveis protéicos foram quantificados através do método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Bio-Rad-USA).

5. - Anticorpo: Para os ensaios de ELISA, foi utilizado anti-IgG humano conjugado com peroxidase. O anticorpo foi obtido comercialmente da Sigma-Aldrich Chemical, USA.

6. - Obtenção de células monoclonais e soro: Para a obtenção de soro, foi colhido 5 ml de sangue total em frasco seco, de cada indivíduo a ser estudado. Para a obtenção dos linfócitos, 10 ml de sangue total foi colhido assepticamente em tubo heparinizado. As células foram separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque (d=1.077) (Sigma-Aldrich Chemical, USA) e ajustadas para 2×10^6 linfócitos /ml.

7. - Quantificação de anticorpos anti-Mielina: A presença dos anticorpos foi constatada através do método de ELISA. Utilizamos o método direto, como já foi empregado anteriormente (Lider et al. 1989). As microplacas (Imunolon-NUNC-Dinamarca) foram cobertas com MBP e mielina humana do SNC e SNP diluídas em PBS (pH 7,4) na concentração de 25µg/ml. Após 18 horas de incubação, as reações inespecíficas foram bloqueadas em PBS/BSA 10% por 2 horas em temperatura ambiente. Após as devidas lavagens, as amostras de soro dos indivíduos de todos os grupos, foram adicionados em diferentes concentrações e incubado por 1 hora á temperatura ambiente. O segundo

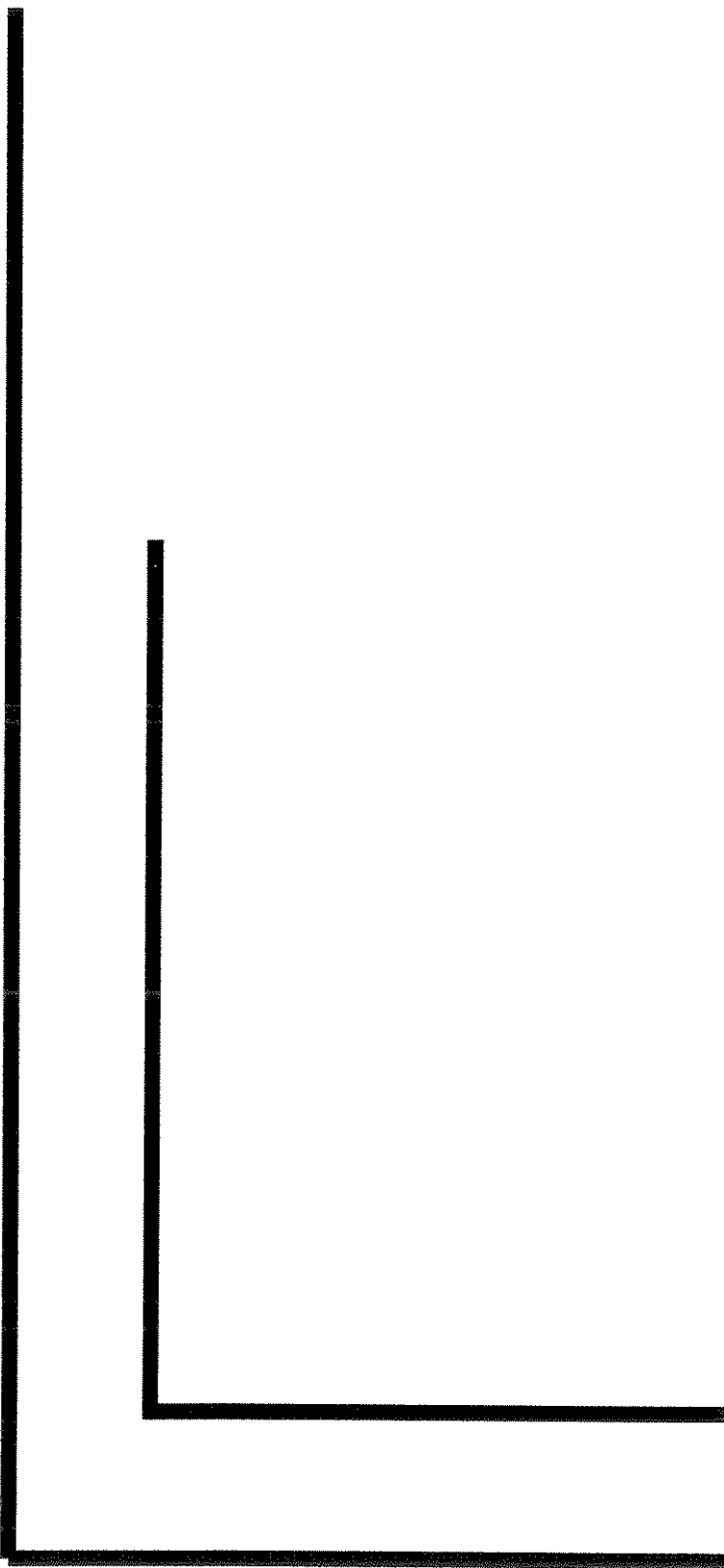
anticorpo foi adicionado (anti IgG humano marcado com peroxidase) na diluição ótima, por 1 hora a temperatura ambiente. Após as lavagens, foram adicionados o substrato (5mg OPD + peróxido de hidrogênio em tampão citrato) e leitura feita em Leitor de ELISA (Labsystem) a 492nm.

8. - Absorção dos soros: Os soros dos pacientes que foram positivos para o ensaio de ELISA foram separados e incubados com 25 µg/ml para MBP central ou mielina do SNP, de acordo com o ensaio realizado por 2 horas a 37°C. A absorção foi repetida por duas vezes e os sobrenadantes foram recolhidos após centrifugação e um novo ensaio de ELISA foi realizado, correndo em paralelo os mesmos soros diluídos não absorvidos. A leitura feita em Leitor de ELISA leitor Multiskan Biochromatic (Labsystem), a 492nm.

9. - Proliferação de linfócitos estimulados com Proteína Básica de Mielina: As suspensões celulares, obtidas como descrito no item anterior, foram ajustadas para a concentração de 2×10^5 células por poço e colocadas em microplaca para cultura de células de 96 poços (Costar, USA). As células foram cultivadas em meio de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) enriquecido com 10% de soro humano AB (Hemocentro da UNICAMP) e 4,25 mg/ml de gentamicina, 1% de glutamina. Os ensaios foram realizados em triplicata. As células foram incubadas em estufa com sistema de CO₂ a uma tensão de 5% e temperatura de 37° C; Incubou-se por 72 horas, na presença de mitógeno inespecífico (5µg/ml) Phytohemaglutinina (PHA). Enquanto que antígenos específicos como a MBP, mielina, peptídeos e TCSE (10µg/ml) foram incubados por 96 horas. Aproximadamente 18 horas antes do término da incubação, cada poço recebeu 1 µCi de timidina tritiada (Duppont-

USA). Após o período de incubação, o excesso de material radioativo foi retirado, lavando-se as células em coletor apropriado (Cell Harvester-modelo 200 A – Cambridge Technology Inc. USA) e colocando-as em tubos padronizados na presença de 2 ml de líquidos de cintilação (3,0 g/l de PPO em Toluol). O conteúdo radioativo foi determinado em cintilador Beta (Beckman LS 6000). Os resultados foram expressos em índice de estimulação.

10. - *Análise estatística* - Os testes estatísticos utilizados na determinação da significância foram: para as análises não paramétricas e análise de variância o Kruskal-Wallis e o teste de Mann-Whitney U test. Para determinar a normalidade foi usado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Considerou-se como significativo as amostras com p menores que 0.05.



4. RESULTADOS

1. Pacientes portadores da forma gastrintestinal da doença de Chagas produzem anticorpos anti-MBP.

A presença de anticorpos anti - MBP foi investigado, com o objetivo de estudar os danos observados no nervo periférico de pacientes portadores de doença de Chagas na forma gastrintestinal. A figura 1 (A e B) mostra um aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de anticorpos que reconhecem a MBP, quando comparados aos grupos controles (figura 1-C, 1-D e 1-E - Forma indeterminada, Esofagite de Refluxo e Indivíduos normais). A especificidade destes anticorpos foi confirmada pela absorção com MBP. Este processo remove anticorpos específicos para MBP presente no soro. Portanto, a significativa redução ($p < 0,001$) dos níveis de anticorpos observado nas figuras 1-A e 1-B mostram a especificidade destes anticorpos.

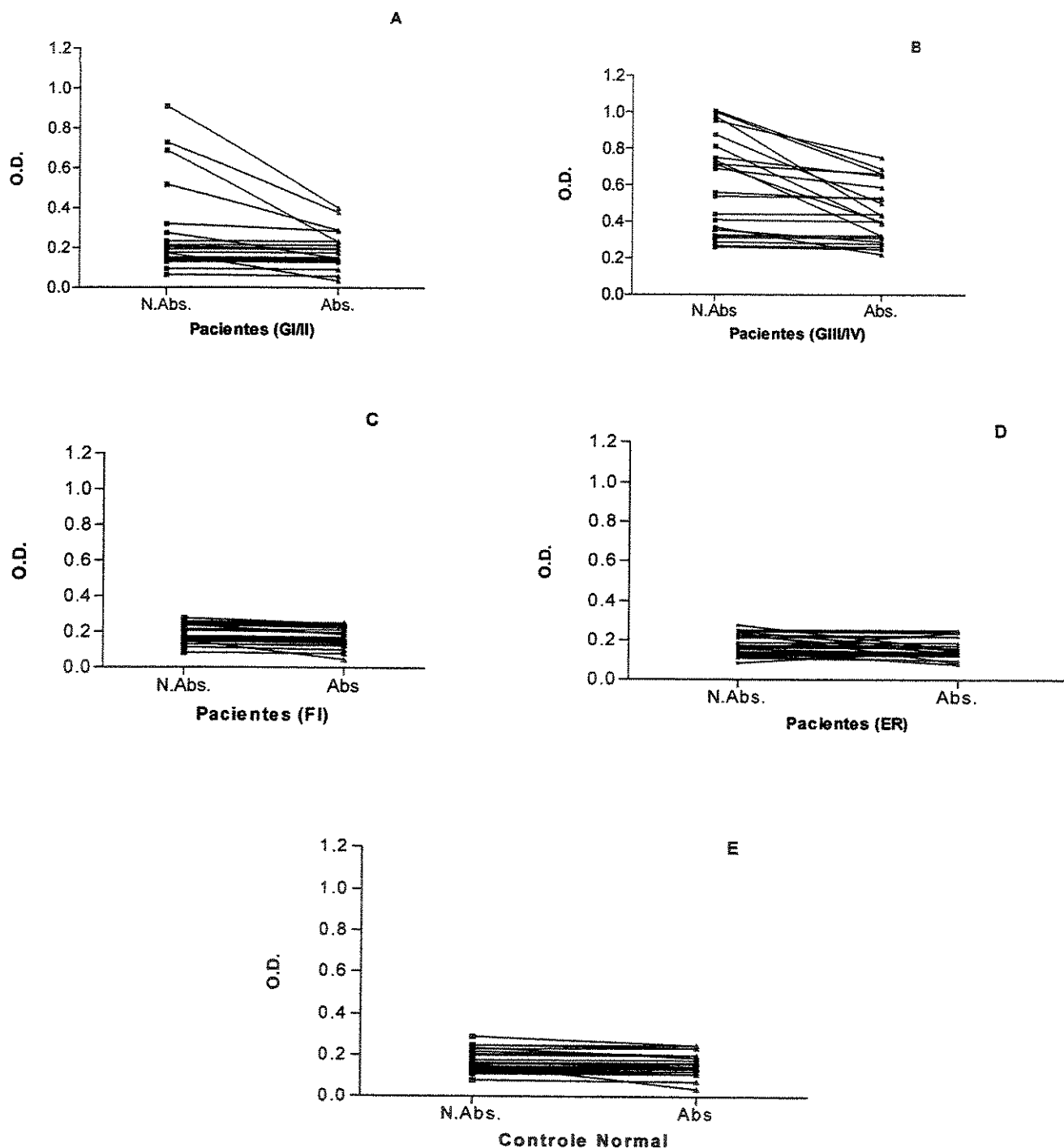


Figura 1. Quantificação de anticorpos anti-MBP no soro de pacientes portadores da forma gastrointestinal e grupos controles. O teste de ELISA foi realizado de duas formas, na coluna da esquerda temos o soro somente diluído, enquanto que na coluna da direita os soros destes pacientes foram absorvidos com 25 ug de MBP, com o objetivo de testar a especificidade destes anticorpos.

2. Linfócitos T de pacientes portadores da forma gastrintestinal da Doença de Chagas reconhecem os antígenos da mielina.

A estimulação com mitógeno inespecífico (PHA) foi realizada no sentido de avaliar a competência imunológica destes indivíduos. A resposta proliferativa a PHA foi avaliada nos cinco grupos (I/II, III/IV, FI, ER e N) e os resultados foram mostrados na Figura 2-A. Os linfócitos dos indivíduos normais ($n=21$) proliferam em resposta a PHA como mostram os dados apresentados na figura 1A ($IE\ 59,1 \pm 24,24$), essa resposta foi significativamente menor ($p<0.001$) nos pacientes portadores da forma gastrintestinal da Doença de Chagas dos grupos III/IV ($IE\ 29,72 \pm 20,44$) ($n=32$) e I/II ($IE\ 21,50 \pm 6,93$) ($n=22$). No entanto, não se observou diferença significativa nos indivíduos com a forma indeterminada da doença FI ($IE\ 39,83 \pm 16,24$) $n=12$ e com esofagite de refluxo ER ($IE\ 51,35 \pm 21,87$) $n=17$ em relação ao grupo dos indivíduos normais.

Este experimento foi realizado com o objetivo de estudar se os pacientes portadores da forma gastrintestinal da doença de Chagas (graus I/II e III/IV) possuem clones que reconhecem antígenos do parasita. A figura 2-B demonstra um aumento significativo da resposta proliferativa de linfócitos com TCSE ($IE\ 4,17 \pm 0,71$) ($n=17$) em relação ao grupo de indivíduos normais ($1,85 \pm 0,81$) ($n=17$).

Os danos tissulares observados nas doenças auto-imunes órgão-específicas resultam da resposta efetora dos linfócitos T. Estes experimentos foram conduzidos com o objetivo de investigar a resposta de linfócitos de pacientes portadores da forma gastrintestinal da Doença de Chagas, à mielina derivada de nervos periféricos. A resposta proliferativa de linfócitos também foi avaliada frente aos neuroantígenos. Linfócitos dos indivíduos dos diferentes grupos (I/II, III/IV, FI, ER e N) foram cultivados na presença de mielina e MBP do SNC e mielina do SNP. Os resultados apresentados na figura 2-C mostram que a resposta proliferativa de linfócitos de pacientes com a forma gastrintestinal da Doença de Chagas, III/IV ($IE\ 3,31 \pm 2,15$) ($n=32$) e Grupo I/II ($IE\ 3,30 \pm 2,74$) $n=$ está significativamente aumentada ($p<0.001$) em relação aos indivíduos assintomáticos FI ($IE\ 1,35 \pm 0,48$), os portadores de esofagite de refluxo ER ($IE\ 1,44 \pm 0,55$) e de indivíduos

saudáveis (IE $1,34 \pm 0,39$). Resultados similares foram observados quando a resposta para MBP (SNC) e mielina (SNP) foi avaliada. Os resultados da resposta proliferativa de linfócitos para MBP (SNC) apresentados na figura 2- D mostram aumento significativo ($p < 0.001$) da resposta dos pacientes do G III/IV (IE $3,98 \pm 2,24$) e GI/II (IE $3,34 \pm 1,51$) em relação aos grupos controles FI, ER e indivíduos normais (IE $1,63 \pm 0,43$; $1,40 \pm 0,43$; $1,51 \pm 0,34$) respectivamente.

A estimulação de linfócitos com mielina derivada dos nervos periféricos (Figura 2-E) dos pacientes com grave comprometimento gastrointestinal grupo III/IV (IE $5,40 \pm 3,88$) está significativamente aumentada ($p < 0.001$) em relação aos demais grupos estudados I/II, FI, ER e indivíduos normais (IE $3,69 \pm 2,20$; $1,62 \pm 0,33$; $1,44 \pm 0,38$) respectivamente.

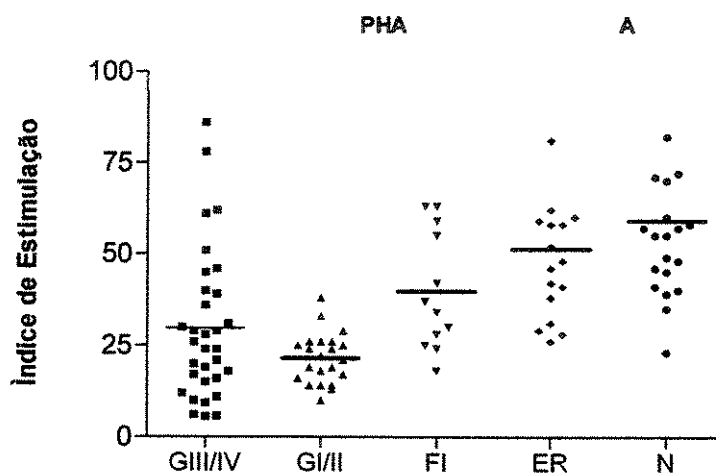


Figura 2-A - Resposta proliferativa de linfócitos de pacientes com a síndrome dos *megas* e grupos controles estimulados com mitógeno inespecífico PHA.

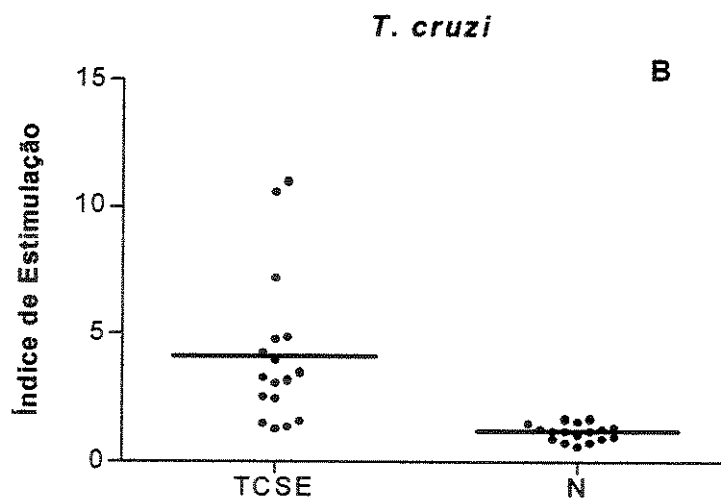


Figura 2-B - Resposta proliferativa de linfócitos de pacientes com síndrome dos *megas* e indivíduos normais estimulados com antígenos derivados do *Trypanosoma cruzi* (TCSE).

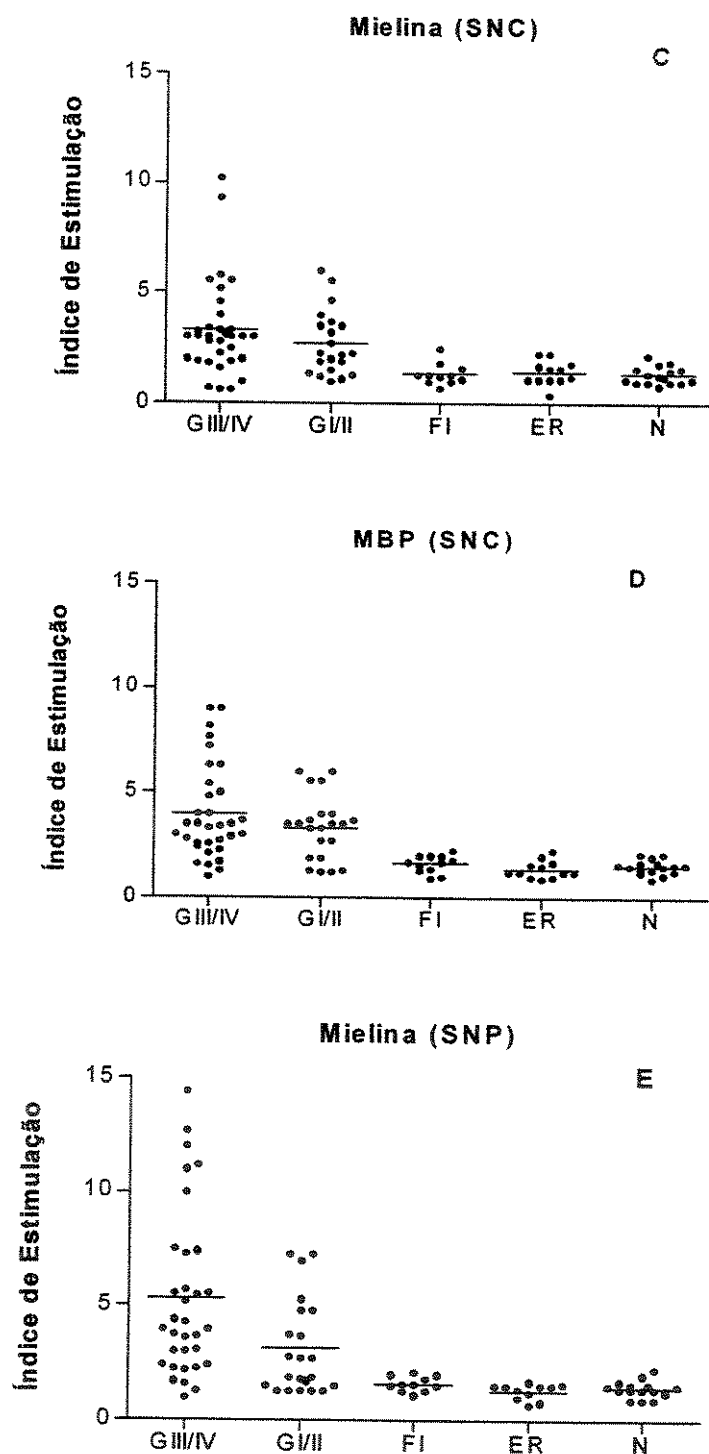


Figura 2-C, 2-D e 2-E. Resposta proliferativa de linfócitos de pacientes com as formas assintomática e gastrointestinal da doença de Chagas e grupos controles, estimulados com antígenos da mielina derivadas do sistema nervoso central e periférico.

3. Linfócitos T de pacientes portadores da forma gastrintestinal da Doença de Chagas reconhecem peptídeos da MBP

Esses experimentos foram realizados no sentido de identificar epitopos da molécula de MBP nos pacientes que previamente responderam aos neuroantígenos. Os resultados são apresentados em índice de estimulação, onde o índice de cada paciente estimulado com uma sequência de peptídeo específica foi dividido pelo índice do grupo de indivíduos normais. Estes resultados demonstram que linfócitos dos pacientes portadores da Doença de Chagas, que desenvolveram a forma digestiva da doença reconhecem preferencialmente aminoácidos da sequência de 1-30 da molécula de MBP (Figura 3).

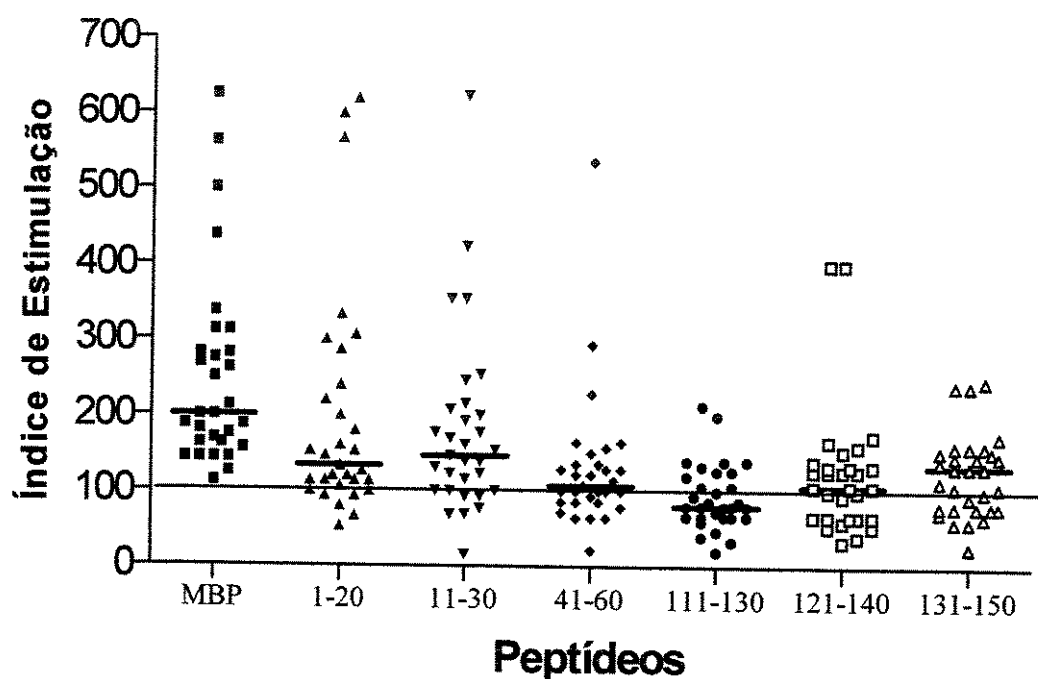
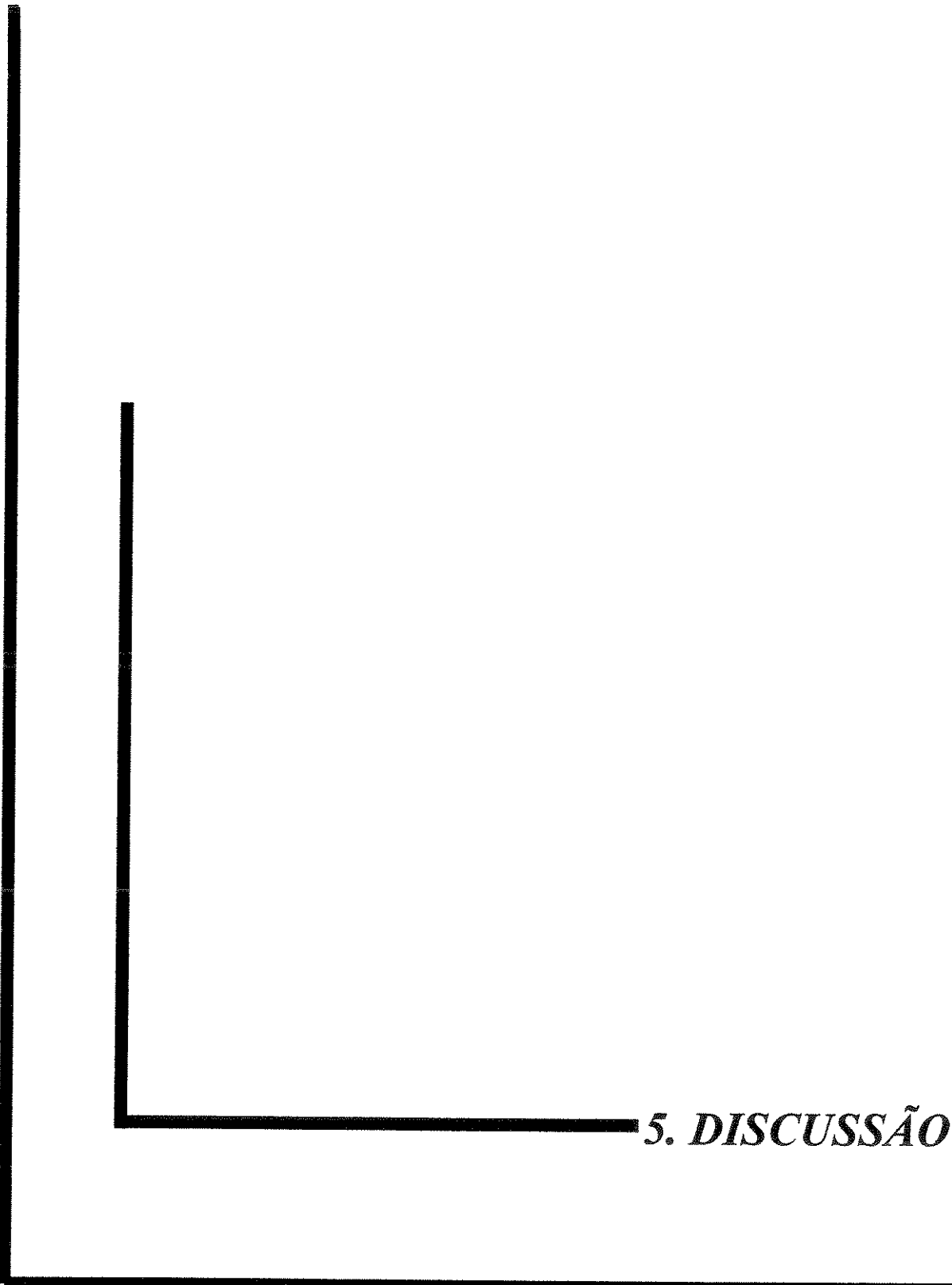


Figura 3. Reposta proliferativa de linfócitos á peptídeos de MBP humano em pacientes portadores da doença de Chagas que desenvolveram a forma gastrintestinal da doença. Os resultados são apresentados em índice de estimulação, os quais o índice de cada amostra foi dividido pela média do índice de estimulação dos grupos de indivíduos normais para cada peptídeo x 100.



5. DISCUSSÃO

A síndrome dos “Megás” é observada em 5 a 10% dos 16 milhões de indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. Os principais fatores envolvidos na patogenia da forma digestiva da doença de Chagas são, alterações ao longo do trato digestivo ocasionadas por lesões dos plexos nervosos (destruição neuronal simpática), com conseqüentes alterações da motilidade e morfologia, sendo o megaesôfago e o megacólon as manifestações mais comuns.

O estudo dos mecanismos e a natureza das alterações imunológicas envolvidas no dano tecidual, característico desta forma da doença, receberam pouca atenção nos últimos anos. Diante disso, no presente estudo, são apresentadas evidências que demonstram a associação entre resposta auto-imune aos componentes da mielina, em paciente portadores de doença de Chagas que desenvolveram a forma digestiva (Megaesôfago e Megacólon) da doença. Para tanto, foram analisados soros e linfócitos de 162 indivíduos, sendo 42 normais, 26 portadores de esofagite de refluxo, 27 pacientes portadores da forma indeterminada da doença de Chagas, 70 pacientes portadores de manifestações gastrintestinais sendo 27 classificados como grau I/II e 43 com grau III/ IV (Anexo II).

A presença de anticorpos específicos para a proteína básica de mielina (MBP) foi encontrada em 26% dos pacientes com manifestações gastrintestinais de graus I e II e acima de 73% dos pacientes com as formas III e IV da doença (Figura 1-A e 1-B); esses anticorpos estavam ausentes nos demais grupos de indivíduos estudados (Figura 1-C, 1-D e 1-E); cabendo ressaltar essa ausência nos pacientes portadores da forma assintomática da doença de Chagas (Figura 1-C). A especificidade dos anticorpos para a proteína básica de

mielina foi comprovada nos ensaios de absorção, onde a diminuição dos níveis dos anticorpos foi significativa ($p < 0.001$) nos dois grupos de pacientes com a forma gastrintestinal da doença (G I/II e III/IV).

Há evidências de que a intensa ativação policlonal dos linfócitos T e B observada na fase aguda da doença de Chagas originaria clones autoreativos que, eventualmente estariam envolvidos no desenvolvimento das reações auto-imunes na fase mais tardia da doença (SPINELLA et al., 1990). Várias evidências indicam um papel importante destes anticorpos no desenvolvimento da autoimunidade na doença de Chagas, sugerindo a existência de uma reação cruzada entre o *T. cruzi* e o tecido nervoso de mamíferos (VAN VOORHIS et al., 1991). Estudos prévios mostraram a presença de anticorpos anti-neurônios no soro de pacientes portadores da Doença de Chagas crônica (RIBEIRO DOS SANTOS et al., 1979). Nos anos 80, vários grupos mostraram em modelo experimental, anticorpos monoclonais que reconheciam componentes do *T. cruzi* e simultaneamente o tecido neural (KHOURY et al., 1979; ISRAELSKI et al., 1988). Posteriormente, BONFA e colaboradores (1993) observaram a presença de anticorpos dirigidos contra proteínas ribossomais, e que a produção destes anticorpos era devido ao reconhecimento de estruturas do próprio e de antígenos do parasita. No entanto, nenhum grupo mostrou a participação direta dos auto-anticorpos causando dano tecidual, sendo que a presença dos auto-anticorpos era mais indicativa da atuação de linfócitos auto-reativos.

As lesões teciduais observadas nas doenças auto-imunes órgão-específicas são causadas principalmente por linfócitos, nas reações de hipersensibilidade do tipo IV. A reação de hipersensibilidade tardia é bem descrita nos modelos experimentais como na Encefalomielite Experimental Auto-imune (BEN-NUN e COHEN, 1982), Neurite

experimental Auto-imune (ROSTAMI et al.1997) e Diabetes experimental. Trabalhos realizados no modelo experimental de doença de Chagas mostraram a presença de infiltrados de células inflamatórias na cardiomiopatia chagásica (CUNHA NETO et al. 1996, 1998, KALIL et al. 1996), assim como no nervo ciático de animais infectados com *T. cruzi*, sendo que a transferência adotiva de linfócitos T CD4 causava lesões desmielinizantes em animais normais (SAID et al., 1985, FAZAN e LANCHAT, 1997, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ et al, 1987).

Diante disto, no presente trabalho foi nosso objetivo verificar se linfócitos de pacientes portadores da Doença de Chagas, mais especificamente os pacientes com a forma gastrointestinal da doença, reconhecem componentes da mielina. Num primeiro momento, foi importante verificar a função dos linfócitos desses pacientes. Assim, a resposta proliferativa dos linfócitos, foi testada frente ao mitógeno inespecífico, PHA, e ao extrato de *T. cruzi*.

Ativação ou transformação linfocitária, refere-se a um processo *in vitro* que se correlaciona ao processo que regularmente ocorre quando linfócitos do hospedeiro, especificamente sensibilizados, interagem com o antígeno. É a técnica mais comumente usada para avaliar a imunidade celular, por medir a capacidade funcional dos linfócitos proliferarem em resposta a um estímulo antigênico ou mitogênico. Com relação à resposta proliferativa dos pacientes estimulados com a PHA a figura 2-A mostra que pacientes portadores da doença de Chagas, tanto na forma assintomática, como os portadores da forma gastrointestinal da doença, apresentaram resposta proliferativa deficiente quando comparados com a resposta de indivíduos normais ou portadores de esofagite de refluxo. A deficiente resposta proliferativa de linfócitos de pacientes portadores da doença de Chagas

foi previamente descrita tanto para humanos como no modelo experimental. Essa resposta deficiente foi explicada pela intensa ativação policlonal dos linfócitos acontecida na infecção com o parasita, que se segue normalmente de imunossupressão, que é devida à maior produção de citocinas com ação antiinflamatória como IL 10 e TGF β , com conseqüente inibição de citocinas como IL2 e IFN γ .

Mitógenos são estimulantes policlonais e requerem sensibilização prévia do indivíduo como no caso dos antígenos. Enquanto os mitógenos estimulam grande número de linfócitos, os antígenos estimulam uma população bem menor de células especificamente sensibilizadas ao antígeno. No sentido de verificar a capacidade funcional dos linfócitos dos pacientes portadores da forma grave da doença de Chagas reconhecer, e responder aos antígenos de *T. cruzi*, linfócitos desses pacientes foram cultivados na presença de um extrato solúvel de *T. cruzi* (TCSE). Como pode ser verificada na figura 2-B, a capacidade de reconhecimento e resposta funcional dos linfócitos desse grupo de doentes está preservada, pois essas células respondem proliferando quando em contato com o antígeno específico.

De posse dessas informações, o próximo passo foi verificar se os linfócitos dos pacientes portadores da forma gastrointestinal da doença reconheciam como antígenos componentes da mielina. Foi observado que os linfócitos de uma parcela significativa dos pacientes com manifestações gastrintestinais classificados como grau I/II e III/IV (Figura 2-C e 2-D) respondem proliferando, quando cultivados na presença de mielina e MBP obtidas do SNC, em comparação com os demais controles (FI, ER e indivíduos normais). Não se observa diferença significativa na resposta de linfócitos de pacientes dos grupos I/II e III/IV quando se utilizou mielina e MBP do SNC. Linfócitos dos pacientes dos dois grupos reconhecem igualmente esses antígenos. No entanto, sob o estímulo da mielina derivada do

SNP (Figura 2-E), os linfócitos dos pacientes com a manifestação gastrintestinal mais severa, respondem mais eficientemente. Esses dados sugerem a participação dos linfócitos nos danos ao tecido nervoso, observado nessa forma da doença de Chagas.

Basicamente, a ativação dos linfócitos T necessita de dois sinais. O primeiro é dado pela interação entre o peptídeo antigênico com as moléculas de MHC das células apresentadoras do antígeno e o receptor para o antígeno presente nos linfócitos (TCR). O segundo sinal é dado pela ligação de moléculas co-estimulatórias presentes tanto nos linfócitos, como nas células apresentadoras do antígeno. O presente trabalho teve continuidade no sentido de identificar o epítipo da molécula de MBP que é reconhecido pelos linfócitos dos pacientes portadores da forma gastrintestinal da doença de Chagas. Foram testados alguns peptídeos que juntos compõem a molécula de MBP, e os resultados apresentados na figura 3 mostram que as regiões 1-20 e 11-30, portanto, 1-30, são preferencialmente reconhecidas pelos linfócitos dos pacientes.

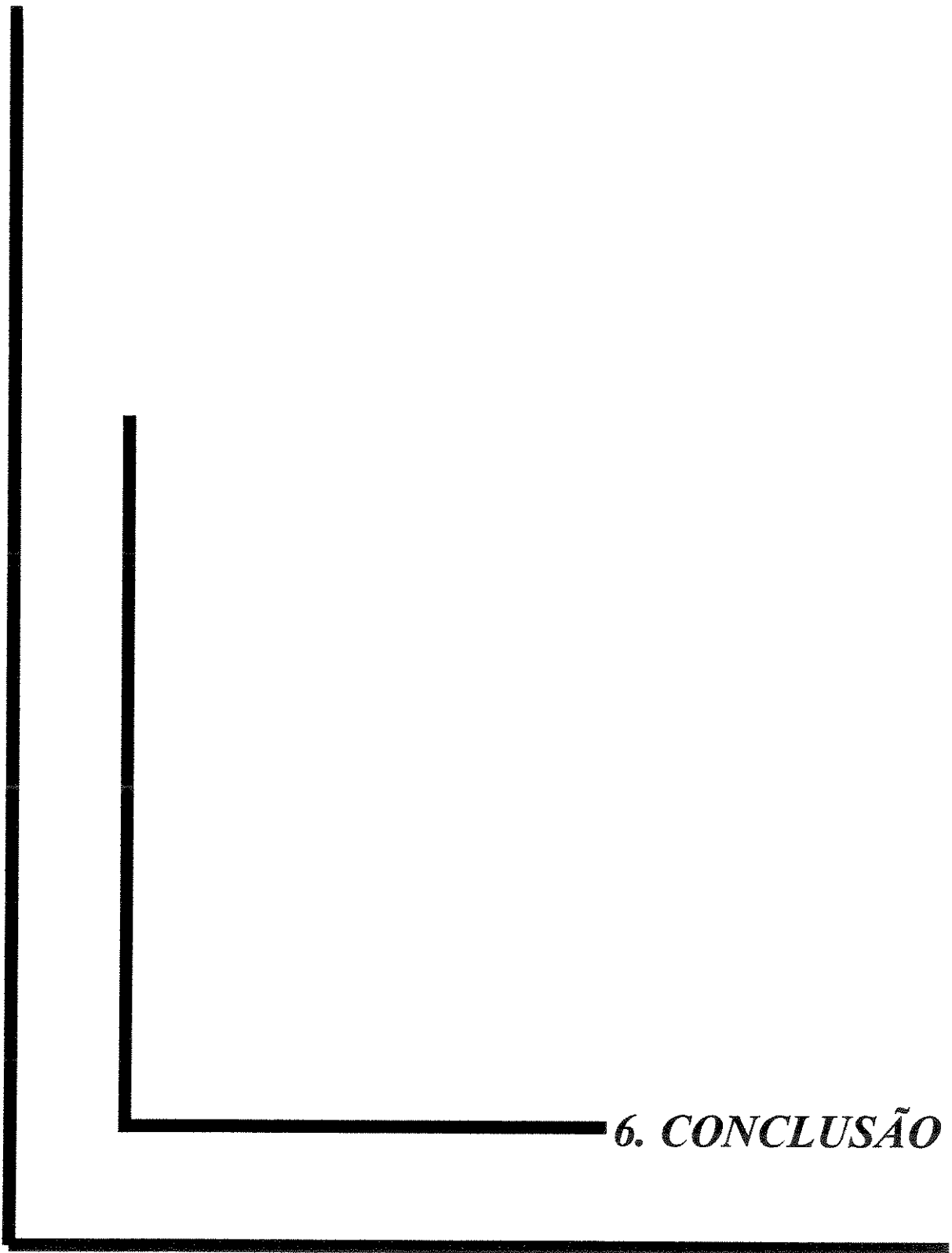
O emprego da molécula de MBP derivada do sistema nervoso central para estudo de reações imunológicas que normalmente acontecem no sistema nervoso periférico é perfeitamente adequado, pois estudos prévios mostraram que a molécula de MBP do sistema nervoso central é idêntica à fração P1 do sistema nervoso periférico. Estudo e caracterização das proteínas da mielina do sistema nervoso periférico mostraram que a mesma é composta por três proteínas principais: P0, P1 e P2. As frações P0 e P2 são exclusivas do sistema nervoso periférico, enquanto a P1 com peso molecular de 18 000 Da, é idêntica à MBP do sistema nervoso central (WHITAKER et al., 1981). Dessa forma os dados obtidos mostrando a resposta dos linfócitos estimulados pela molécula de MBP derivada do SNC e mielina do SNP, assim como aos peptídeos da região 1-30 da molécula

de MBP, sugerem que os linfócitos dos pacientes com a forma gastrointestinal da doença de Chagas, igualmente reconhecem essas estruturas no sistema nervoso periférico.

O fato de, pouco ou nenhum parasita ser encontrado no organismo dos indivíduos infectados, na fase crônica da doença de Chagas, tem levado os autores a inferir que os danos observados tanto nos tecidos cardíacos como nervosos são resultados de reações auto-imune. Embora ainda haja grupos de pesquisadores, que discordem dessa teoria, pelo fato de ter sido encontrado DNA do parasita em indivíduos infectados, nos últimos anos as evidências que mostram aspectos de autoimunidade na Doença de Chagas têm sido bem aceitos pela comunidade científica. Esta hipótese tem como ponto principal que a agressão aos tecidos cardíaco e gastrointestinal na ausência do parasita seria consequência de uma resposta imunológica contra epítomos do *T. cruzi*, que apresentasse reação cruzada contra antígenos próprios. O aparecimento de neurites periféricas após infecções com vírus e bactérias reforçam a hipótese de mimetismo molecular. A existência de seqüências de aminoácidos parecidos ou idênticos encontradas no parasita e no tecido nervoso do hospedeiro já foi demonstrada na doença de Chagas. A ocorrência de mimetismo molecular foi demonstrada através do estudo de uma proteína flagelar do *T. cruzi* (FI-160) e uma proteína neuronal de 47 kDa (VAN VOORHIS e EISEN, 1989).

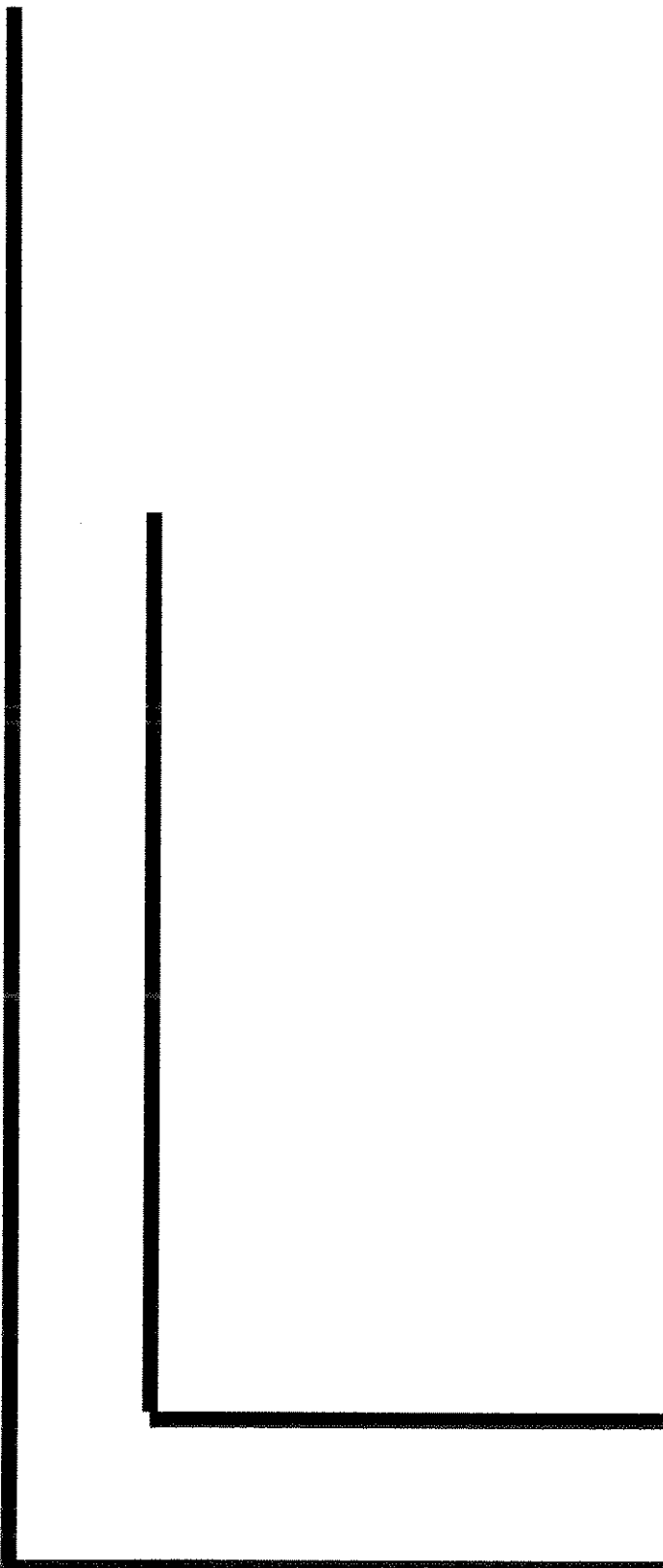
Os dados apresentados no presente trabalho não nos permitem afirmar a existência de mimetismo molecular, uma vez que o antígeno de *T. cruzi* utilizado não foi purificado, e não mostramos similaridade entre os epítomos da molécula de MBP e os do parasita. No entanto, o estudo é relevante, pois é o primeiro na literatura a estabelecer associação entre a gravidade da doença, na forma gastrointestinal, e a presença de resposta imune dirigida para os componentes da mielina, em especial para a molécula e epítomos da

MBP. Embora estudos adicionais sejam necessários para estabelecer similaridades com estruturas antigênicas do parasita, os resultados discutidos aqui revelam um avanço significativo na compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese da forma gastrointestinal da Doença de Chagas.



6. CONCLUSÃO

- Pacientes portadores da doença de Chagas que desenvolveram a Síndrome dos “Megas” possuem anticorpos que reconhecem neuroantígenos do sistema nervoso central e periférico;
- Pacientes portadores da doença de Chagas que desenvolveram a Síndrome dos “Megas” possuem linfócitos específicos que reconhecem neuroantígenos do sistema nervoso central e periférico e antígenos do *T. cruzi*;
- Pacientes com Síndrome dos “Megas” reconhecem a sequência de 1-30 da molécula de MBP;



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, L.C.J., KALIL, J. & CUNHA-NETO, E. Molecular mimicry between cardiac-myosin and *Trypanosoma cruzi* –antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin. **Braz J Med Biol Res**, 30:1305-1308, 1997.

ADAD, S.J., ANDRADE, D.C.S., LOPES, E.R. & CHAPADEIRO, E. Contribuição ao estudo da anatomia patológica do megaesôfago chagásico. **Rev Inst Med Trop de São Paulo**, 33: 445-450, 1991.

ALDERSON MR, TOUGH TW, DAVIS-SMITH T, BRADDY S, FALK B, SCHOOLEY KA, GOODWIN RG, SMITH CA, RAMSDELL F, LYNCH DH. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. **J Exp Med**, 181: 71-7, 1995.

ALMERIGOGNA, F.; D'ELIOS, M.M.; DE CARLI M, D.E.L.; PRETE, G. Markers of Th1 and Th2 cells. **Chem Immunol**, 63: 30-50, 1996.

ANDRADE, SG. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Rev Soc Bras Med Trop**, 18: 39-46, 1985.

ANDRADE, A.L.; ZICKER, F.; SILVA, I.G.; SOUZA, J.M.; MARTELLI, C.M. Risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection among children in central Brazil: a case-control study in vector control settings. **Am J Trop Med Hyg**, 52: 183-7, 1995.

- ABROMSON-LEEMAN, S., BRONSON R., AND DORF, M.E. Experimental autoimmune peripheral neuritis induced in Balb/c mice by myelin basic protein specific T cell clones. **J Exp Med**, 182: 587-592, 1995.
- ADAD, S.J., ANDRADE, D.C.S., LOPES, E.R. & CHAPADEIRO, E. Contribuição ao estudo da anatomia patológica do megaesôfago chagásico. **Rev Inst Med Trop de São Paulo**, 33: 445-450, 1991
- AL-SABBAGH, A., GARCIA, C.A.A.C., DIAZ BARDALEZ, B.M., ZACCARIAS C., SANTOS, L.M.B. Evidence for cross reactivity between antigen derived from *Trypanosoma cruzi* and myelin basic protein. **Exp Parasitol**, 89: 304-311, 1998.
- ANTUNES, CMF. Association between strains of *Trypanosoma cruzi* and clinical varieties of Chagas' disease. Design of epidemiological studies: A review. **Rev Soc Bras Med Tropical**, (18) 17-21, 1985.
- BEARD, C.B., DOTSON, E.M., PENNINGTON, P.M., CORDON-ROSALES, C., DURVASULA, R.V. Bacterial symbiosis and paratransgenic control vector-borne Chagas disease. **Int J Parasitol**, 31: 621-627, 2001.
- BACHMANN, M.F.; KOPF, M. On the role of the innate immunity in autoimmune disease. **J. Exp Med**, 193: 47-50, 2001.

BEN-NUN, A.; COHEN, I. R. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) mediated by T cell lines: process of selection of lines and characterization of the cells. **J Immunol**, 129: 303 – 308, 1982.

BONFA, E.; VIANA, V.S.; BARRETO, A.C.; YOSHINARI, N.H.; COSSERMELLI, W. Autoantibodies in Chagas' disease. An antibody cross-reactive with human and *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. **J Immunol**, 150: 3917-23, 1993.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Ann Rev Microbiol**, 27: 347- 382, 1973.

BRENER Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Adv Parasitol**, 18: 247-92, 1980.

BRENER, Z. General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. **Rev Soc Bras Med Tropical**, 18: 1-8, 1985.

BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annu Rev Microbiol**, 49: 175-200, 1995.

BURLEIGH, B.A.; WOOLSEY, A.M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cell Microbiol**, 4: 701-11, 2002.

BUSCAGLIA, C.A; DI NOIA, J.M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes Infect**, 5: 419-27, 2003.

CHAPADEIRO, E.; SILVA, E.L.; SILVA, A.C.M.; FERNANDES, P.; RAMIREZ, L.E. Cardiac neuronal depopulation in hamsters (*Mesocricetus auratus*) chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Soc Bras Med Tropical**, 32: 35-39, 1999.

CHAPADEIRO E. Clinical evolution and morbi-mortality in Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 94 Suppl 1: 309-10, 1999.

CORREA-OLIVEIRA, R.; GOMES, J.; LEMOS, E.M.; CARDOSO, G.M., REIS, D.D.; ADAD, S.; CREMA, E.; MARTINS-FILHO, O.A.; COSTA, M.O.; GAZZINELLI, G.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 94: 253-5, 1999.

CORSINI, A.C.; COSTA, M.G.; OLIVEIRA, O.L.; CAMARGO, I.J.; RANGEL, H.A. A fraction (FAd) from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes depresses the immune response in mice. **Immunology**, 40: 505-11, 1980.

COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas' disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 97: 3-24, 2002.

CUNHA-NETO, E., COELHO, V., GUILHERME, L., GIORELLI, A., STOLF, N., KALIL, J. Autoimmunity in Chagas' Disease. Identification of cardiac myosin - B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patients. **J Clin Invest**, 98: 1709-1712, 1996.

- CUNHA-NETO, E., RIZZO, L.V., ALBUQUERQUE, F., ABEL, L., GUILHERME, L., BOCCHI, E., BACAL, F., CARRARA, D., IANNI, B., C. MADDI, C., KALIL, L. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cell in Chagas' disease cardiomyopathy. **Braz. J. Med and Biol Research**, 31:133-137, 1998.
- D'AVILA REIS, D.; LEMOS, E.M.; SILVA, G.C.; ADAD, S.J.; MCCURLEY, T.; R CORREA-OLIVEIRA, R.; MACHADO, C.R.. Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 95: 177-8, 2001.
- D'IMPERIO-LIMA, M.R., JOSKOWICZ, M., COUTINHO, A., KIPNIS, T. AND EISEN, H. VERY large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Euro J Immunol**, 15: 201-203, 1985.
- DE OLIVEIRA, R.B., TRONCON, L.E., DANTAS, R.O., MENGHELLI, U.G. Gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Am J Gastroenterol** 93: 884- 9, 1998.
- DE OLIVEIRA JUNIOR, W. An undetermined form of Chagas' disease: medico-occupational implications. **Arq Bras Cardiol**, 54: 89-91, 1990.
- DEIBLER, G.E., MARTENSON, R.E. AND KIES, M.W. Large scale preparation of myelin basic protein from Central Nervous Tissue of several mammalian species. **Preparations Biochemistry**. 2: 139-165, 1972.

DEVERA R, FERNANDES O, COURA JR . Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 98:1-12, 2003.

DIAS, J.C.P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. **Rev Soc Bras Med Trop**. 22(3): 147-56, 1989.

DIAS, J.C.P Control of Chagas Disease in Brazil. **Parasitol Today**. 11: 334-41, 1987.

ENGMAN, D.M.; LEON, J.S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. **Acta Trop**, 81: 123-32, 2002.

FAIRWEATHER, D.; KAYA, Z.; SHELLAM, G.R.; LAWSON, C.M.; ROSE, N.R. From infection to autoimmunity.. **J Autoimmun**, 16: 175-86, 2001.

FAZAN, V.P.; LACHAT, J..J. Qualitative and quantitative morphology of the vagus nerve in experimental Chagas' disease in rats: a light microscopy study. **Am J Trop Med Hyg**, 57: 672-7, 1997.

FERREIRA, W.; BELEM, Z.R.; MOURA, M.E.G; CAMARGO, M.E. Aspectos da padronização de testes sorológicos para a doença de Chagas: um teste imunoenzimático para triagem de doadores de sangue. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 33: 123-128, 1991.

GARCIA, C.A.; OLIVEIRA, E.C.; SAKURADA, J.K.; SANTOS, L.M. Protective immunity induced by a *Trypanosoma cruzi* soluble extract antigen in experimental Chagas' disease. Role of interferon gamma. **Immunol Invest**, 29: 1-12, 2000.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; JAMES, S.L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur J Immunol**, 22: 2501-6, 1992.

GOMES, J. A. S.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G., ROCHA, M. O. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R.. Evidence that Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease Is Due to a Th1-Specific Immune Response. **Infect Immun**, 71: 1185 – 1193, 2003.

GRAUERT, M.R.; HOUDAYER, M.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease. **Clin Exp Immunol**, 93: 85-92, 1993.

HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; SAID, G.; MILON, G.; MARCHAL, G.; EISEN, H. L3T4+ T cells able to mediate parasite-specific delayed-type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. **Eur J Immunol**, 17: 1027-33, 1987.

HERNACHUDHA, T.; GRIFFIN, D.E.; GIFFELS, J.J.; JOHNSON, R.T.; MOSER, A.B.; PHANUPAK, P. Myelin basic protein as an encephalitogen in encephalomyelitis and polyneuritis following rabies vaccination. **The New England Journal of Medicine**, 316: 369-374, 1987.

HIGUCHI, M.L.; BRITO, T.; REIS, M.M.; BARBOSA, A.; BELLOTTI, G.; PEREIRA-BARRETO, A.; PILEGGI, F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immuno-histochemical findings. **Cardiovasc. Pathol**, 2: 101-106, 1993.

HUDSON, L. Autoimmune phenomena in chronic Chagasic cardiopathy. **Parasitol Today**, 1: 6-9, 1985.

ISRAELSKI, D.M.; SADLER, R.; ARAUJO, F.G. Antibody response and antigen recognition in human infection with *Trypanosoma cruzi* **Am J Trop Med Hyg**. 39: 445-55, 1988.

KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Autoimmunity in Chagas' Disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? **Parasitology Today**, 12: 396-399, 1996.

KHOURY, E.L.; RITACCO, J.; COSSIO, P.M.; LAGUENS, R.P.; SFARMAN, A.; DIEZ, C.; ARANA, R. Circulating antibodies to peripheral nerves in American Trypanosomiasis (Chagas' Disease). **Clin Exp Immunol**, 36: 8-15, 1979.

KHOURY, S. J.; AKALIN, E.; CHANDRAKER, A.; TURKA, L. A.; LINSLEY, P. S.; SAYEGH, M. H. & HANCOCK, W. W. CD28-B7 Costimulatory blockade by CTLA41g prevents actively induced Experimental Encephalomyelitis and inhibits Th1 but spares Th2 cytokines in the Central Nervous System. **J. Immunol**, 155: 4521 – 4524, 1995.

KIERSZENBAUM, F. Chagas' Disease and the Autoimmunity Hypothesis **Clin. Microbiol. Rev**, 12: 210 – 223, 1999.

LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; RAMIREZ, L.E.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.; CHIARI, E. Relationship between Trypanosoma cruzi and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. **Am J Trop Med Hyg**, 65: 435 – 441, 2001.

LEMOS, E.M.; REIS, D.; ADAD, S.J.; SILVA, G.C.; CREMA, E., CORREA-OLIVEIRA, R. Decreased CD4(+) circulating T lymphocytes in patients with gastrointestinal chagas disease. **Clin Immunol Immunopathol**, 88: 150-5, 1988.

LENARDO, M.; CHAN, F.K.; HORNING, F.; McFARLAND, H.; SIEGEL, R.; WANG, J. & ZHENG, L. Mature lymphocyte Apoptosis-Immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. **Annu Rev Immunol**, 17: 221-253, 1999.

LENSCHOW, D. J.; WALUNAS, T. L.; BLUESTONE, J. F. CD28/B7 System of T cell costimulation. **Annu Rev Immunol**, 14: 233 – 258, 1996.

LIDER, O.; SANTOS, L.M.B.; LEE, C.S.Y.; HIGGINS, P.J.; WEINER, H.L. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by the oral administration of myelin basic

protein. II Suppression of the disease and *in vitro* immune responses mediated by antigen-specific CD8+ T lymphocytes. **J Immunol**, 142: 748-753, 1989.

LINSLEY, P.S.; LEDBETTER, J.A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. **Annu Rev Immunol**, 11:191-212, 1993.

MARIN-NETO, J.A.; ALMEIDA FILHO, O.C.; PAZIN-FILHO, A.; MACIEL, B.C. Indeterminate form of Chagas' disease. Proposal of new diagnostic criteria and perspectives for early treatment of cardiomyopathy. **Arq Bras Cardiol.**, 79: 623-7, 2002.

MARTINS, G.A.; VIEIRA, L.Q.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 Ligand (Faz-L) Expression and Nitric Oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. **Infection and Immunity**, 67: 3864-3871, 1999.

MEIRELLES, M.N.L.; CHIARI, E.; DE SOUZA, W. Interaction of bloodstream, tissue culture-derived and axenic culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. **Acta Tropica**, 39: 195-203, 1992.

MELO, R.C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J Parasitol.** 64: 475-82, 1978.

MILES, M.A; FELICIANGELI, M.D.; DE ARIAS, A.R. American trypanosomiasis

(Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. **BMJ**, 28: 1444-8, 2003.

MINOPRIO, P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? **Intennat J Parasitol**, 31: 588-591, 2001.

MONTES, C.L.; ZUNIGA, E.L.; VAZQUEZ, J.; ARCE, C.; GRUPPI, A. Trypanosoma cruzi mitochondrial malate dehydrogenase triggers polyclonal B-cell activation. **Clin Exp Immunol**, 127: 27-36, 2002.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**, 7: 145-73, 1989.

NOGUEIRA, N.; COHN, Z. Trypanosoma cruzi: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. **J. Exp. Med.**, 143: 1402 – 1420, 1996.

O'GARRA, A.; MURPHY, K. Th1 and Th2 Cells in Health and Disease: Role of cytokines in development of Th1 and Th2 cells. **Chem. Immunol**, 63: 1-13, 1996.

ORTIZ-ORTIZ, L.; PARKS, D.E.; RODRIGUEZ, M.; WEIGLE, W.O. Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, 124: 121-6, 1980.

PORTELA-LINDOSO, A.A.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. **Rev Saude Publica**. 37: 107-15, 2003.

PRATA, A. Significance of *Trypanosoma cruzi* differentiation and selection, relationship with clinical and epidemiological varieties. **Rev Soc Bras Med Tropical**, 18: 9-16, 1985.

PRATA, A. Classificação da infecção chagásica no homem. **Rev Soc Bras Med Tropical**, 23: 109-113, 1990.

RASSI A JR.; RASSI A.; LITTLE W.C. Chagas' heart disease. **Clin Cardiol**, 23: 883-9, 2000.

ROMAGNANI, S. The Th1/Th2 paradigm. **Immunol Today**, 18: 263-266, 1997.

REED, S.G. Immunology of *Trypanosoma cruzi* infections. **Chem Immunol**. 70: 124-43, 1998.

REIS, D.D.; JONES, E.M.; TOSTES, S. JR.; LOPES, E.R.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D.G.; MCCURLEY, T.L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α ⁺ cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. **Am J Trop Med Hyg**, 48: 637-44, 1993.

REZENDE, J.M.; MOREIRA, H. Chagasic megaesophagus and megacolon. Historical review and present concepts. *Arq Gastroenterol*, 25: 32-43, 1988.

RIBEIRO DOS SANTOS, R.; MARQUEZ, J.O.; VON GAL FURTADO, C.C; RAMOS DE OLIVEIRA, J.C.; AR MARTINS, A.R.; KOBERLE, F. Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. *Tropenmed Parasitol*, 30: 19-23, 1979.

RIBEIRO DOS SANTOS, R., ROSSI, M.A. , LAUS, J.L., SILVA, J.S., SAVINO, W., MENGEL, J. Anti CD4+ abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*, 175: 29-36, 1992.

RIZZO, L.V., CUNHA-NETO., E. AND TEIXEIRA, A.R.L. Autoimmunity in Chagas' Disease: Specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, 57: 2640- 2644, 1989.

ROBERTS, A.; KEMP, C. Chagas' disease (American trypanosomiasis). *J Am Acad Nurse Pract* 13(4):152-3, 2001.

ROWLAND, E.C.; CHEN, Z. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* egress from infected fibroblasts is mediated by CD4+ and mu+ immune cells. *J Parasitol*, 89: 733-7, 2003.

- ROSE, N.R. The role of infection in the pathogenesis of autoimmune disease. **Semin Immunol**, 10: 5-13, 1998.
- ROSE, N.R. Infection, mimics, and autoimmune disease. **J Clin Invest**, 107: 943-4, 2001.
- ROSTAMI, A.M. P2-reactive T cells in inflammatory demyelination of the peripheral nerve. **J Infect Dis**, 176 Suppl 2: S160-3, 1997.
- SAID, G., JOSKOWICZ, M., BARREIRA, A.A. AND EISEN, H. Neuropathy Associated with Experimental Chagas' Disease. **Annals of Neurology**, 18: 676-683, 1985.
- SEDER, R.A. & PAUL, W.E.. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. **Ann Rev Immunol**, 12: 635 – 673, 1994.
- SILVEIRA, A.C. Current situation with chagas disease vector control in the Americas. **Cad Saude Publica**. 16 Suppl 2:35-42, 2000.
- SNARY, D., FLINT, J.E., WOOD, J.N., SCOTT, M.T., CHAPMAN, M.D., DODD, J., JESSELL, T.M. AND MILES, M.A. A monoclonal antibody with specificity for *Trypanosoma cruzi*, central and peripheral neurones and glia. **Clin Exp Immunol**, 54: 617-624, 1983.

SOUSA, OE. Isolation and amplification techniques. **Rev Soc Bras Med Tropical**, (18) 23-27, 1985.

SPINELLA, S.; MILON, G.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M . A CD4+ TH2 cell line isolated from mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* induces IgG2 polyclonal response in vivo. **Eur J Immunol**, 20: 1045-51, 1990.

TANOWITZ, H.B. Chagas' disease. **Clin. Microbiol. Rev**, 5: 400-419, 1992.

TARLETON, R.L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, 144: 717-24, 1990.

TARLETON, R.L. AND ZHANG, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? **Parasitol. Today**, 15: 94-99, 1999.

TARLETON, R.L. Chagas disease: a role for autoimmunity? **Trends Parasitol**, 19: 447-51, 2003.

ZHANG, L., AND TARLETON, R.L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **J. Infect. Dis**, 180 (2) 480-486, 1999.

TEIXEIRA, M.L., REZENDE FILHO, J., FIGUEIREDO, F., TEIXEIRA, A.R.L. Chagas' disease: Selective affinity and cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi*-immune lymphocytes to parasympathetic ganglion cells. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, 75:33-45, 1980.

VACCHIO, M.S.; ASHWELL, J.D. T cell tolerance. **Chem Immunol**, 58: 1-33, 1994.

VAGO, A.R.; MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P.; ANDRADE, L.O.; CHIARI, E.; GALVAO, L.M.; REIS, D.; PEREIRA, M.E.; SIMPSON, A.J.; TOSTES, S.; PENA, S.D. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. **Am. J. Pathol.**, 149: 2153 – 2159, 1996.

VAN VOORHIS, V.C. AND EISEN, H. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. **J Exp Med**, 169: 641-652, 1989.

VAN VOORHIS, W.C., SCHELEKEWY, L. AND TRONG, H.L. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the Fl-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12 aminoacid peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 88: 5993-5997, 1991.

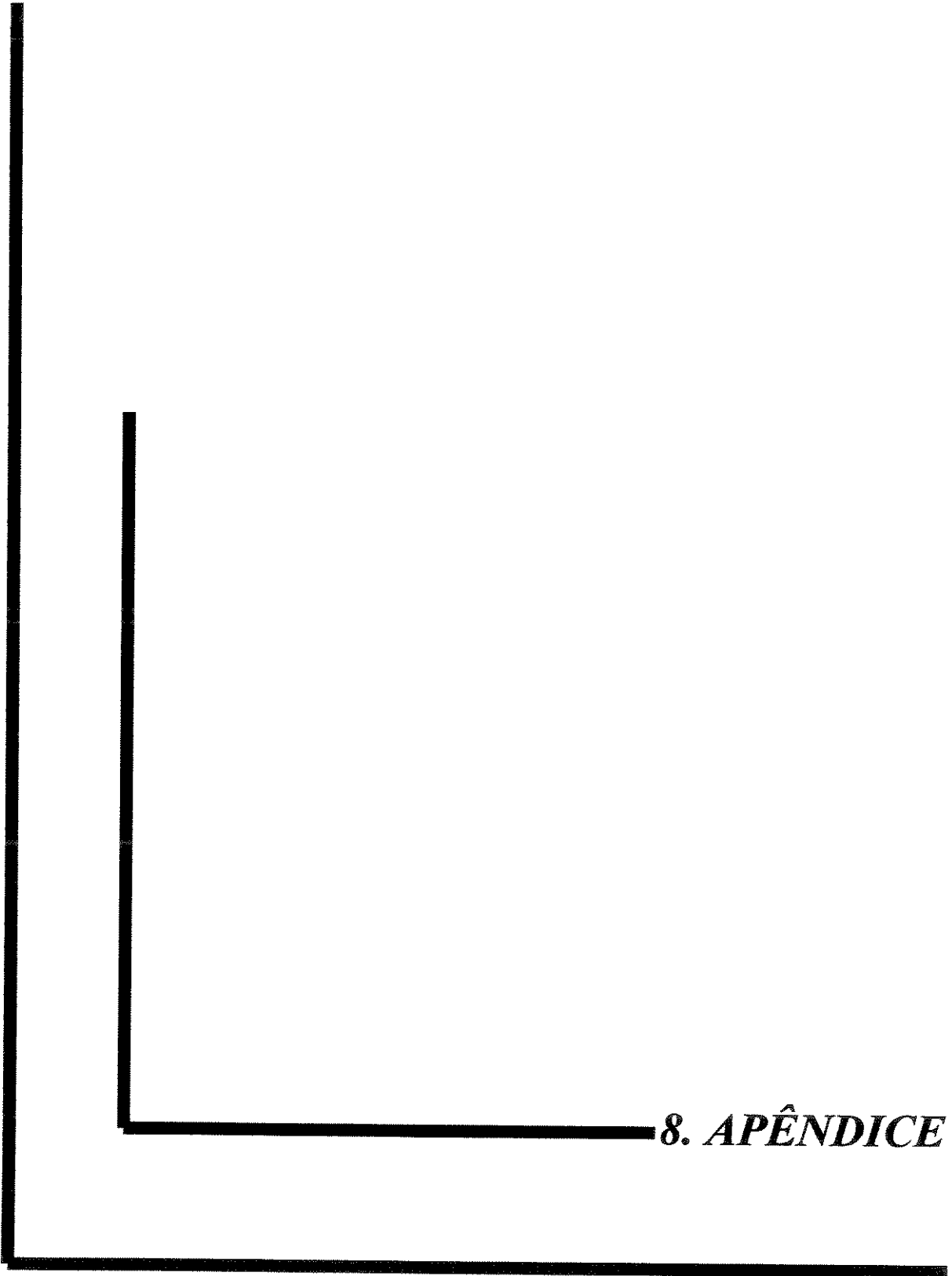
WHITAKER, J.N. The protein antigens of peripheral nerve myelin. **Ann Neurol**, 9: 56-64, 1981.

WOOD, J.N., HUDSON, L. JESSELL, T.M., AND YAMAMOTO, M. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasite. **Nature**, 296: 34-38,1982.

WHO. Control of Chagas' disease. Report of a WHO Expert Committee. **WHO Technical Report Series**. nº 811, Geneva, 95 p, 1991.

YANG, X-D.; TISCH, R.; Mc DEVITT, H. O. Selective targets for immunotherapy in autoimmune disease. **Chem. Immunol.** **60**: 20 – 31, 1995.

ZHANG, L., TARLETON, R.L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **J. Infect Dis**, 180(2), 480-486, 1999.



8. *APÊNDICE*

APÊNDICE I

CASUÍSTICA

	Nome	Sexo	Idade	Patologia	Sorologia Chagas
A1	ABS	M	45	Normal	negativo
A2	MG	F	27	Normal	negativo
A3	AMR	M	23	Normal	negativo
A4	DV	M	20	Normal	negativo
A5	MF	F	22	Normal	negativo
A6	CB	F	25	Normal	negativo
A7	BM	F	32	Normal	negativo
A8	CA	F	30	Normal	negativo
A9	RF	M	21	Normal	negativo
A10	AS	F	19	Normal	negativo
A11	CM	M	21	Normal	negativo
A12	MA	F	20	Normal	negativo
A13	FB	F	25	Normal	negativo
A14	OL	M	26	Normal	negativo
A15	GLS	F	28	Normal	negativo
A16	SBP	F	32	Normal	negativo
A17	AMS	M	21	Normal	negativo
A18	MF	F	35	Normal	negativo
A19	RCB	F	35	Normal	negativo
A20	GMC	F	36	Normal	negativo
A21	SMSN	F	37	Normal	negativo
A22	RCB	F	19	Normal	negativo
A23	AEG	M	23	Normal	negativo
A24	AG	F	26	Normal	negativo
A25	LMF	M	19	Normal	negativo
A25	KEB	M	24	Normal	negativo
A26	RV	M	20	Normal	negativo
A27	MSS	F	65	Normal	negativo
A28	NMS	F	42	Normal	negativo
A29	LVO	M	19	Normal	negativo
A30	PCVB	F	21	Normal	negativo
A31	GDCVB	M	23	Normal	negativo
A32	GFC	M	24	Normal	negativo
A33	AF	M	27	Normal	negativo
A34	AFC	F	22	Normal	negativo
A35	NFC	F	20	Normal	negativo
A36	VBP	M	22	Normal	negativo
A37	PLA	M	21	Normal	negativo
A38	ECO	F	36	Normal	negativo
A39	DEMH	F	24	Normal	negativo
A40	GB	F	23	Normal	negativo

A41	JRDE	M	24	Normal	negativo
A42	S	F	38	Normal	negativo
B1	GC	M	54	E. refluxo	negativo
B2	LD	F	45	E. refluxo	negativo
B3	PGN	M	50	E. refluxo	negativo
B4	MALBS	F	41	E. refluxo	negativo
B5	AJS	M	43	E. refluxo	negativo
B6	JPO	M	66	E. refluxo	negativo
B7	JKRGS	F	64	E. refluxo	negativo
B8	BAR	F	47	E.Refluxo	negativo
B9	LGS	F	41	E.Refluxo	negativo
B10	MCL	M	33	E.Refluxo	negativo
B11	PCTR	F	63	E.Refluxo	negativo
B12	ARF	F	69	E.Refluxo	Negativo
B13	LAO	F	46	E.Refluxo	Negativo
B14	CRC	M	50	E.Refluxo	Negativo
B15	ESB	F	58	E.Refluxo	Negativo
B16	LC	F	52	E.Refluxo	Negativo
B17	RAA	M	39	E.Refluxo	Negativo
B18	NRE	F	60	E.Refluxo	Negativo
B19	LCC	F	42	E.Refluxo	Negativo
B20	NMV	F	51	E.Refluxo	Negativo
B21	KIM	M	32	E.Refluxo	Negativo
B22	LMB	M	22	E.Refluxo	Negativo
B23	MNG	F	45	E.Refluxo	Negativo
B24	SER	M	36	E.Refluxo	Negativo
B25	AGM	M	41	E.Refluxo	Negativo
B26	MCR	F	26	E.Refluxo	Negativo
C1	BJB	M	49	FI	+
C2	ZRO	M	29	FI	+
C3	NAP	F	25	FI	+
C4	JRR	M	62	FI	+
C5	GSC	F	45	FI	+
C6	MA	M	64	FI	+
C7	AAD	M	40	FI	+
C8	CSR	F	60	FI	+
C9	IPR	M	34	FI	+
C10	JLR	M	42	FI	+
C11	CRC	M	35	FI	+
C12	RSS	M	56	FI	+
C13	JPS	M	46	FI	+
C14	MLFD	F	28	FI	+
C15	RL	M	56	FI	+
C16	JCF	F	73	FI	+
C17	JCF	F	-	FI	+
C18	JAS	M	32	FI	+
C19	IPS	F	50	FI	+
C20	LMF	F	38	FI	+

C21	TFL	F	70	FI	+
C22	MVM	F	55	FI	+
C23	NFC	F	45	FI	+
C24	ORF	F	51	FI	+
C25	KLR	M	34	FI	+
C26	LLO	M	31	FI	+
C27	LAC	F	26	FI	+
D1	JRS	M	36	ME G II	+
D2	FSC	F	56	ME G I	+
D3	JMS	M	55	ME G II	+
D4	AMS	M	34	ME G II	+
D5	LMP	M	49	ME G I	+
D6	JSS	M	72	ME G I /MC	+
D7	VRS	M	41	ME G II	+
D8	ASN	F	64	ME G II	+
D9	SRM	M	39	ME G II	+
D10	VMB	F	45	MC II	+
D11	EAM	M	34	ME G I	+
D12	VSSB	F	50	ME G I/II	+
D13	DV	F	56	ME G I/ II	+
D14	MCF	F	43	ME G I/ II	+
D15	ACSM	F	68	ME G II	+
D16	IBR	F	30	ME G II	+
D17	ORS	M	45	ME G I/ II	+
D18	MVM	F	55	ME G II	+
D19	AJP	M	-	ME G II	+
D20	MRV	F	41	ME G II	+
D21	TGF	F	66	ME G I/II	+
D22	SM	M	60	ME G II	+
D23	DGP	M	-	ME G I/II	+
D24	IBR	F	29	ME G I/II	+
D25	LFC	F	46	ME G I/II	+
D26	GRBM	F	50	ME G I/II	+
D27	CAR	F	54	ME G I/II	+
E1	ACN	M	39	ME G IV	+
E2	RNPS	M	32	ME G III	+
E3	AGM	M	42	ME G III	+
E4	MLGP	F	47	MC	+
E5	JIS	M	69	ME G III	+
E6	AFT	F	72	ME G III	+
E7	OCR	F	73	MEGIII/MC	+
E8	SC	M	83	MEGIII/MC	+
E9	JRM	M	47	MEGIII	+
E10	FGA	M	35	ME G III	+
E11	PLAS	M	40	ME G II	+
E12	MMS	M	51	MEGIII/MC	+
E13	AAR	M	-	MEGII	+
E14	FGS	M	50	ME G II	+

E15	MPA	M	36	MEGII	+
E16	RF	F	56	MEGIII/MC	+
E17	JH	M	52	MEGIV/MC	+
E18	JC	M	68	MEGIV/MC	+
E19	OMS	F	58	MC G IV	+
E20	DLB	M	46	MC G IV	+
E21	AAM	M	53	MC G IV	+
E22	GMS	M	38	MC G IV	+
E23	ABP	M	44	MC G IV	+
E24	MRD	F	53	MC G IV	+
E25	MJS	F	62	MC G IV	+
E26	ML	F	44	MC G III	+
E27	SS	M	40	MC G III	+
E28	JAE	M	52	MC G III	+
E29	AC	M	57	MC G III	+
E30	ACSM	F	68	MC G III/IV	+
E31	OOR	M	79	MC G III/IV	+
E32	DMM	F	58	MC G III/IV	+
E33	MD	F	51	MC G III/IV	+
E34	FGA	M	47	MC G III/IV	+
E35	JB	M	44	MC G III/IV	+
E30	MBO	M	33	MC G III/IV	+
E31	MCCM	F	75	MC G III/IV	+
E32	JQG	M	49	MC G III/IV	+
E33	JPS	M	56	MC G III/IV	+
E34	DGO	F	29	MC G III/IV	+
E35	MAJ	F	42	MC G III/IV	+
E36	VMF	M	51	MC G III/IV	+
E37	JML	M	61	MC G III/IV	+
E37	DLB	M	46	MC G III/IV	+
E38	AAS	M	58	MC G III/IV	+
E39	RBG	M	42	MC G III/IV	+
E40	OAS	F	64	MC G III/IV	+
E41	GRBM	F	65	MC G III/IV	+
E42	JBS	M	65	MC G III/IV	+
E43	IMOM	F	50	MC G III/IV	+

APÊNDICE II

NEUROPATHY OF GASTROINTESTINAL CHAGAS' DISEASE: AUTOREACTIVE RESPONSE TO MYELIN ANTIGENS

Elaine C. Oliveira^a, Marcia M. Fujisawa^b, Dannie E.M. Hallal Longo^a, Alessandro dos Santos Farias^a, Juliana Contin Moraes^a, Maria Elena Guariento^c, Eros Antônio de Almeida^c, Mario José A. Saad^c, Francesco Langone^d, Marcos H. Toyama^c, Nelson A. Andreollo^b, Leonilda M. B. Santos^{a*}

^aNeuroimmunology Unit – Department of Microbiology and Immunology, ^bDept. of Surgery, ^cDepartment of Internal Medicine, ^dDepartment Physiology and Biophysics, University of Campinas (UNICAMP) – Campinas – SP – Brazil. ^eUniversity of São Paulo (UNESP).

Running title: Autoreactive response to myelin antigens in chronic Chagas' disease

Key words: mega syndromes/autoimmunity/ myelin basic protein

Address correspondence: Leonilda M. B. Santos Ph.D. – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biologia – UNICAMP – Campinas – SP – Brazil CEP 13083 - 970 – Phone 55.19.37886262, FAX: 55.19.37886276 E mail: leonilda@unicamp.br

Abstract

Most reports of autoimmune response during infection with the parasite *Trypanosoma cruzi* have dealt with the cardiomyopathic form of Chagas' disease, but there is another, less common, gastrointestinal form, which is studied here. Chronically infected patients with a severe gastrointestinal form of Chagas' disease present increased antibody production and proliferative responses to peripheral myelin components, such as myelin basic protein and peripheral nerve structures. T lymphocytes preferentially recognize a region on the myelin basic protein (MBP) molecule (1-30), which suggests that the MBP is a potential target on the peripheral nerve for autoimmune reactions in patients with gastrointestinal lesions resulting from Chagas' disease.

1. Introduction

Chagas' disease, caused by infection with the intracellular protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is a major public health problem in Latin America. Approximately 16-18 million people are infected, and an additional 100 million individuals are at risk [1]. Chagas' disease involves an acute phase and a later chronic phase, occurring many years after the initial infection. The acute phase is characterized by the presence of parasites circulating in the bloodstream, with local inflammation at the sites of infection. During the chronic phase, however, no circulating parasites are observed, although progressive damage affects various tissues and organs, such as the heart and nervous tissues [2-3]. About 20 to 30% of patients develop cardiomyopathy of variable severity, whereas for 8 to 10%, the disease evolves into a digestive disorder characterized by pathological dilatation of the esophagus and/or colon (megaesophagus and/or megacolon) [2-4].

The facts that antibodies recognize both parasite and host tissue and that tissue damage appears in the absence or near absence of the parasite suggest that autoimmune mechanisms may be responsible for Chagas' disease [reviewed in ref. [5-7]]. Although the autoimmunity hypothesis has been questioned by many authors due to the persistence of the *T. cruzi* antigen in the chronic phase of the disease, such a persistence would not exclude the possibility of autoimmune reactions. It has recently been demonstrated that mitochondrial kinetoplast DNA (kDNA) of *T. cruzi* can be transferred to human host DNA. Moreover, *T. cruzi* kDNA incorporated into chickens and rabbits is inherited by the F2 generation, yet in the absence of persistent infection [8]. These data suggest that such kDNA integration and the eventual presentation of the relevant antigens in the absence of infection may account for the autoimmune reactions observed in patients with chronic

Chagas' disease. Other mechanisms, such as parasite-induced polyclonal activation of lymphocytes, the expression of cryptic self epitopes, bystander activation and molecular mimicry [5-6] have also been proposed as possible explanations for the autoimmunity observed during *T. cruzi* infection.

Several studies have demonstrated the role of cardiac myosin as a major heart-specific autoantigen in the cardiomyopathy of Chagas's disease [9-10]. Some authors have succeeded in demonstrating that in an animal model immunization with *T. cruzi* contributes to cardiac tissue damage [11] and that the adoptive transfer of CD4 T cells from infected mice to naive recipients induces cardiac graft rejection [12]. Moreover, the induction of tolerance using myosin antigens reduces cardiac inflammation in chronically infected mice [13]. Little is known, however, about the mechanisms of tissue damage involved in the gastrointestinal form of the disease, but the patients generally present abnormalities in the enteric nervous system, characterized by systematic damage of the peripheral nerve plexus by an inflammatory reaction and a consequent reduction in neurons [14-15]. Despite the importance of this form of the disease in endemic areas, the immune mechanisms involved in the tissue damage have not received adequate attention in recent years.

In the 1980's, a study of the cross-reactivity of serum antibodies and autoreactive T lymphocytes in the nervous tissue of chagasic patients revealed cross-reactions of nervous-tissue antigens with monoclonal antibodies secreted against nervous tissue or *T. cruzi* antigens [16]. Moreover, there is evidence that demyelinated lesions are caused by inflammatory infiltrates in the sciatic nerve after the adoptive transfer of CD4 lymphocytes from mice infected with *T. cruzi* [17]. Evidence also suggests cross-reactivity between antigens derived from *T. cruzi* and myelin basic protein (MBP) in experimental Chagas'

disease, based on the study of overlapping peptides in the MBP molecule, and two regions responsible for this cross-reactivity have been identified [18].

The present study has investigated the cross reactivity of antibodies and lymphocytes from patients with severe gastrointestinal syndromes involving myelin components, such as MBP or proteins derived from peripheral nerves.

2. Materials and Methods

2.1 Patients

The patients in this study were seen at the Chagas' Disease Clinic (GEDOCH) at the University Hospital of the State University of Campinas (UNICAMP). The samples analyzed were obtained from individuals from areas of Brazil where the disease is endemic who tested positive for Chagas's disease, with those with a severe form of the disease waiting for gastric surgery. None of these patients had received any treatment in the two-month period prior to the donation of the blood. Patients with a form of the disease affecting the megaesophagus and the megacolon were divided into four groups according to the severity of the disease, as classified [14], on the basis of the intensity of X ray alterations, especially contractibility and the diameter of the organ: Stage I patients with normal esophageal diameter and delay in evacuation; Stage II patients with moderate dilation of the esophagus accompanied by retention; Stage III patients with a moderate to extreme dilation and retention accompanied by decreased motor activity, and Stage IV patients with extreme dilation and prolongation of the organ. The classification of megacolon alteration was based on the diameter of the sigmoid colon sample obtained during surgery. In the present study, the distribution of patients in these categories was as follows: 25 patients (13 female /12 male) in Stages I and II (moderate involvement MOD group), and 49 patients (17 male/32 female) in Stages III and IV (severe involvement SEV group). 27 serum positive patients (13 male /14 female) were classified as asymptomatic (ASY); 26 individuals (11 male/ 15 female) with inflammatory gastro-esophageal reflux (GR) and normal leukocytes samples taken from 41 healthy individuals (male19 /22

female) from the same endemic area, but testing negative for Chagas' disease (N); Informed consent was obtained from all individuals prior to their inclusion in the study.

2.1 Purification of Mononuclear Cells

Blood samples (15 ml) were collected under sterile conditions. Cells were separated on a Ficoll-Hypaque gradient (1.077 density), and the cell concentration adjusted to 2×10^6 cells/ml.

2.3 Human myelin

Humans brains were removed from patients who had died from non-neurologic causes, with removal occurring an average of 2 h after death. The white matter was removed and myelin isolated by overlaying the homogenate in isotonic (0.32M) sucrose on a denser sucrose (0.85 M) gradient, thus allowing the myelin to migrate down to the interface [19-20]. The myelin was then isolated by centrifugation and pooled, dialysed against water at 4°C, and lyophilized.

2.4 Extraction of peripheral nerve protein

Segments of the sciatic nerve were removed from patients who had died from non-neurologic causes, with removal conducted an averaged of 2 h after death. The tissue was delipidated with chloroform/methanol (2:1 v/v), and then with acetone and ether. The dry powder was homogenized and extracted for 20 min with ice-cold water, and the pellet was then recovered after centrifugation for 10 min at 40 000 g at 0°C. The water-soluble proteins were discarded. The pellet was reextracted four times, each time for 1-3 h with an ice-cold solution of 0.06 M HCl containing 0.2 M NaCl. The supernatants were isolated by centrifugation and pooled, dialysed against water at 4°C, and lyophilized.

2.5 Human Myelin Basic Protein (MBP)

MBP was purified from human brain tissue by the method of Diebler et al. 1972 [21].

2.6 Myelin basic protein peptides

These peptides were synthesized by Genemed Synthesis, CA, USA. MBP 1-20 (MASQKRPSQRHGSKYLATAST); 11-30 (HGSKYLATASTMDHARHGFL); 41-60 (NPSIGRFFGGDRGAPKRGSGKV); 111-130 (VVHFFKNIVTPRTPPPSQ); 121-140 (VTPRTPPPSQGKGRGLSLSR); 131-150 (GKGRGLSLSRFSWGAEGQRP).

2.7 Parasite antigen

T. cruzi soluble extract (TCSE) antigens were prepared from *Trypanosoma cruzi*, strain Y, as previously described [22-23]. Parasites from 100 ml of culture (approximately 3×10^9 epimastigotes) were washed three times in ice-cold 0.15 M NaCl by centrifugation at 1400 g for 15 min at 4°C. The final pellet was resuspended in 10 ml distilled water and immediately lyophilized. The lyophilized material was delipidated in portions of 250 mg after washing in organic solvents previously distilled and free of peroxides. The preparation was washed in acetone (2X), in acetone-ethyl ether (1:1; 2X), and, finally, in ethyl ether (2X). Sedimentable material was separated by centrifugation at 3000 g for 15 min at 4°C. The final pellet was dried in an air vacuum and kept in a desicator at 4°C. Two hundred milligrams of the delipidated material were resuspended in 25 ml of ice-cold 0.15 M NaCl and kept in an ice bath with occasional shaking for 10 min. The material was then centrifuged at 12,000g for 30 min at 4°C. The pellet was resuspended in 10 ml PBS (pH 7.2), incubated in a water bath for 1 h at 37°C, and centrifuged at 12,000 g for 30 min at 4°C. The supernatant, was kept at -20°C. The protein content was measured.

2.8 Quantification of MBP antibodies

Briefly, 96-well microtiter plates (NUNC - Denmark) were coated with 25 µg/ml of MBP or myelin in 0.1M NaHCO₃ (pH=8.5) overnight at 4°C. Following blocking with 3% bovine serum albumin-BSA/ PBS for 2h at room temperature, serum, diluted 1: 200 was

added and incubated overnight at 4° C. Then, 0.5-2.0 µg/ml of detection antibody to human IgG (Sigma Chem. MO, USA) was added, followed by the peroxidase substrate. Optical density (OD) was determined at 492 nm. In order to show the specificity of the antibody to MBP, serum positive for the antibody was absorbed twice with MBP, each time being incubated on microplates with immobilized MBP (25µg/ml) for 2h at 4°C, followed by the determination of the level of the antibody in an ELISA assay. This process removed the MBP antibody from the serum, since it remained fixed on the immobilized MBP on the culture plate. The results are expressed as percent of reduction of MBP antibodies after absorption (1-absorbed serum/serum without absorption x100). To avoid variation in results, all serum samples were tested at the same time.

2.9 *Proliferation assay*

Peripheral mononuclear blood cells were purified using a Ficoll-Hypaque gradient. The cells were suspended in Hank's balanced salt solution and washed before the addition of RPMI 1640 medium supplemented with 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, penicillin-streptomycin (Flow lab.-USA), 12,5 mM HEPES buffer (pH=7.4), 0.2% NaHCO₃ and 10% AB+ human serum. The cells were cultured, 10^5 per well, in 96 well flat-bottomed culture plates in the presence of 25 µg/ml of MBP, 10 µg/ml of human myelin or 2 µg/ml of peptides, as well as that of PHA (5 µg/ml). Cells were incubated for 72 h for the nonspecific mitogen, and for 144 h for the antigen, in an humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C; the plates were pulsed with 1.0 µCi of ³H Thymidine (Amershan Biosciences UK) per well and harvested 18 hours later with a cell harvester (Cambridge Tech., MA, USA). The incorporation of ³H Thymidine was assessed by standard liquid scintillation techniques, with the results expressed as the stimulation

index (SI), which is the mean number counts per minute (cpm) of stimulated cells divided by that of unstimulated cells.

2.10 Statistical analysis

The statistical significance of the results was determined using a Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance and the Mann-Whitney U test. To determine normality the Kolmogorov-Smirnov test was used. The alpha-error was corrected by pondered Bonferroni test. A p value smaller than 0.05 was considered to be significant.

3. Results

3.1 MBP antibody production in patients with severe gastrointestinal form of Chagas' disease.

An attempt was made to explain the tissue damage in the peripheral nerves of patients with the gastrointestinal form of Chagas' disease by investigating the presence of autoantibodies to MBP in the serum of these patients. Figure 1 demonstrates the percentage of reduction of antibody to MBP after appropriate absorption with the neuroantigen. A significant increase in the level of MBP antibodies in patients with a severe (SEV) and moderate (MOD) form of the disease over that in asymptomatic individuals (ASY) inflammatory esophagitis (GR) and healthy individuals (N) was demonstrated since a significant reduction ($p < 0.001$) was observed in these two groups after the absorption of the MBP-specific antibodies.

3.2 Myelin antigen stimulation of T lymphocytes from patients with severe gastrointestinal form of Chagas' disease.

The experiments performed here were designed to investigate the lymphocyte response to peripheral myelin molecules in patients with the gastrointestinal form of Chagas' disease. Stimulation with a nonspecific mitogen (PHA) was used to investigate the immunological status of the lymphocytes. The proliferative response to PHA was evaluated for the five groups (SEV., MOD., ASY, GR, N), and the results are given in Figure 2-A. The healthy donor group (N) ($n=21$) and the GR ($n=17$) demonstrated an extensive proliferative response to PHA ($SI\ 59.1 \pm 24.24$ and $GR\ 51.35 \pm 21.87$), which was not significantly different from that of patients with a severe form of Chagas' disease SEV ($SI\ 29.72 \pm 20.44$) ($n=32$); the group with a less severe form of the disease MOD ($SI= 21.50 \pm 6.93$) ($n=22$) and ASY ($SI= 21.50 \pm 6.93$) $n= 12$, however, presented a lower proliferative response than did the control groups.

The T lymphocyte response to myelin antigens from the central (CNS) and peripheral (PNS) nervous systems as well as MBP molecule were examined for the five groups (SEV, MOD, ASY, GR, N). The results, shown in Figure 2-B, demonstrate a significant ($p < 0.001$) increase in the lymphocyte proliferative response to MBP from the groups with a more severe form of the disease SEV ($SI\ 3.31 \pm 2.15$) ($n=34$) and those with a less severe form of the disease MOD ($SI\ 3.30 \pm 2.74$) ($n=22$) in relation to those used as controls ASY ($SI\ 1.35 \pm 0.48$) ($n=12$), GR ($SI\ 1.44 \pm 0.55$) ($n=18$) and healthy individuals ($SI\ 1.44 \pm 0.38$) ($n=22$). Similar results were observed for myelin from the central nervous system. The results of the lymphocyte proliferative response to Myelin (CNS) are shown in Figure 2-C: a significantly increase ($p < 0.001$) in the proliferative response was observed in the patients with Chagas' disease both SEV ($SI\ 3.98 \pm 2.24$) ($n=34$) and MOD ($SI\ 3.34 \pm 1.51$) ($n=23$) in relation to those of control individuals ($SI\ 1.63 \pm 0.43$; 1.40 ± 0.43 ; 1.51 ± 0.34) ASY, GR and healthy individuals respectively.

Lymphocyte stimulation with peripheral nerve myelin for patients with the most severe form of the disease ($SI\ 5.40 \pm 3.88$) was significantly greater ($p < 0.001$) than that of the other groups MOD, ASY, GR and N ($SI\ 3.69 \pm 2.20$; 1.62 ± 0.33 ; 1.44 ± 0.38) respectively (Figure 2-D).

The proliferative response of lymphocytes from patients with advanced disease SEV stimulated with *T. cruzi* antigen was also evaluated. Figure 2-E shows that the lymphocytes of these patients presented a significant increase in the proliferative response ($SI\ 4.17 \pm 0.71$) ($n=17$) in relation to that of control group ($SI\ 1.85 \pm 0.81$) ($n=17$).

3.3 MBP peptides recognition of T lymphocytes from patients with severe gastrointestinal form of Chagas' disease.

Since the lymphocytes from Chagas' disease patients recognize the MBP molecule, the follow experiments were done to identify the regions of the MBP molecule targeted by the

immune response. Various peptides which compose the extreme ends of MBP molecule were tested. The results in Figure 3 represent the proliferative response of lymphocytes from patients with the gastrointestinal form of Chagas's disease belonging to the SEV and MOD groups which had previously recognized the MBP molecule. The results are expressed as stimulation index, which is the index of each sample divided by the mean of the index of stimulation of normal individuals cells stimulated with each peptide x 100. The results show that the lymphocytes from patients with a severe form of Chagas's disease preferentially recognize the amino acid sequence (1-30) of the MBP molecule, since only the peptides 1-20 and 11-30 indicated a significant increase ($p < 0.001$) in the proliferative response of the lymphocytes, while no other peptides stimulated such proliferation of the T cells than did those for the normal control group.

4. Discussion

In the present study, evidence of autoreactive response to myelin components is shown for patients with gastrointestinal syndromes decurrent from chronic Chagas' disease. We have demonstrated that myelin components are recognized by both specific antibodies and lymphocytes from patients with a severe digestive form of Chagas' disease.

The factors controlling the immunoregulatory balance between a protective, pathogen-eliminating immune reaction and a damaging, self-destructive auto-reactive response are complex. It is difficult to distinguish *in vivo* the tissue damage caused by the inflammatory response to a parasite from that caused by an auto-immune reaction, especially since the evidence of auto-immune damage is generally indirect [24]. In the present study, the increased level of antibodies to MBP in the serum of patients with severe Chagas' disease was shown to be specific, since this level decreased after appropriate absorptions of the serum of the patients. Moreover, the results suggest that these antibodies may have clinical significance, since higher levels are positively associated with a more severe forms of the disease and since such antibodies are absent in control individuals. These experiments used MBP from the central nervous system, which is appropriate, since previous studies have shown that such MBP protein is identical to that of the P1 myelin fraction of the peripheral nervous system [25].

The existence of cross-reactive antibodies between *T. cruzi* and mammalian antigens has been found in both humans and experimental models (reviewed in ref.[26]). In the experimental model, the presence of anti-myosin antibodies contributing to tissue damage has been described by various authors. *T. cruzi* infected mice develop severe cardiomyopathy and produce antibodies that recognize the antigens present in a heart extract [27]. In human

studies, the presence of autoantibodies to cardiac myosin was also demonstrated in the sera of patients with Chagas' disease [28]. A cross-reactivity between antibodies from chagasic patients and nerve tissue has also been described [29]. Moreover, cross-reactivity has been shown to occur between the recombinant flagellar *T. cruzi* molecule (Fl-160) and a 47 kDa neuronal protein, with a 12-residue epitope of Fl- 160 capable of competitively inhibiting the binding of anti-Fl-160 antibodies to neural tissues [30-31]. Although the presence of antibodies tends to contribute to tissue damage, in an organ-specific autoimmune reaction, T cell-mediated hypersensitivity is the major mechanism responsible for tissue lesion. The *in vitro* proliferative response is one of the most reliable tests to assess the immunocompetence of T lymphocytes, and a low proliferative response was found for seropositive patients stimulated with nonspecific mitogen (PHA) (Figure 2 A). A number of mechanisms may explain the suppression of cellular immune response during infection, including the abnormal functioning of macrophages and CD4 and CD8 lymphocytes, as well as to an imbalance in the production of antinflammatory and proinflammatory cytokines (reviewed in ref. [32]). Despite this low response to nonspecific mitogens, evidence of the role of autoreactive T cells is presented, showing that lymphocytes from patients with a severe digestive form of the disease recognized the myelin antigens, including MBP. Various regions of the MBP molecule were investigated to identify the portion responsible for the stimulation of the lymphocytes, focus was on the extreme ends of the molecule, since in humans the encephalitogenic epitopes for the MBP molecule are located at these terminal extremes [33]. The data provided in Figure 3 show that the lymphocytes from patients with severe the gastrointestinal syndrome preferentially recognize the amino acid sequence 1-30 (both 1-20 and 11-30), which suggests that the MBP molecule may be the primary stimulus for nerve tissue-damaging T –cells.

Such autoimmune reactions caused by autoreactive T cells have been discussed for decades. Mice chronically infected with *T. cruzi* reject heart grafts, but this does not happen

with normal mice or animals hyperimmune to *T. cruzi*. The depletion of CD4 and CD8 T lymphocytes suggests that the heart tissue damage is due to CD4 T lymphocytes [12]. In human chagasic patients, CD4+ T cell clones were isolated from the cells infiltrating heart lesions and found to proliferate *in vitro* in response to cardiac antigens such as myosin-heavy chain and recombinant *T. cruzi* protein B-13 [10]. In nervous tissue as well, T cell lines from chronically infected mice, cultured with sciatic nerve tissue in the presence of IL2, or with *T. cruzi* antigens, when transferred into the sciatic nerves of normal mice generate granulomas associated with demyelination [34].

Many mechanisms contribute to the tissue damage observed in post-infection autoimmune reactions. The presence of autoantibodies and autoreactive T cells can be explained by the studies that show that the main characteristic of mouse and human infections with *T. cruzi* is the induction of massive lymphocyte polyclonal activation involving B and T cells. These cells, activated by the infection, are responsible for the production of antibodies or the expression of T cell receptors that lack parasite specificity, and they may be involved in late developing autoimmune reactions [35]. Also, molecular mimicry mechanisms based on the abundant epidemiological and experimental evidence of an association between infectious agents and the presence of an autoimmune disease, as well as the cross-reactivity observed between self- antigens and microbial agents, may explain the autoimmune reactions [5]. In the present study, we were not able to demonstrate cross reactivity between myelin components and a specific *T. cruzi* antigen. Thus, further studies are required to demonstrate similarities of the MBP molecule and MBP peptides with the structure of *T. cruzi*; however, the present data are relevant since they are the first to show the importance of the peripheral MBP molecule as a possible target for the autoimmune reaction of patients with a gastrointestinal form of Chagas' disease.

Although efforts are being made to eradicate the causes of infection with *T. cruzi*, such as poor social conditions and the donation of contaminated blood, the risk of infection with this parasite is still high in many developing countries. Moreover, since million of patients are now in the chronic phase of the disease after years of infection, an understanding of the autoimmune reactions in this phase of the disease is extremely important for the design of appropriate therapeutic approaches to control the tissue damage caused by possible autoimmune reactions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the financial support received from FAPESP (grant # 01/12827-0); CNPq (grant # 300375/84-87) and FAEP-UNICAMP; the collaboration of Linda Gentry El-Dash in the linguistic revision of the manuscript, that of Fernanda Ramos Gadelha in furnishing the *T.cruzi* antigen, and of Gislaine C. L. Brito for technical assistance is also recognized.

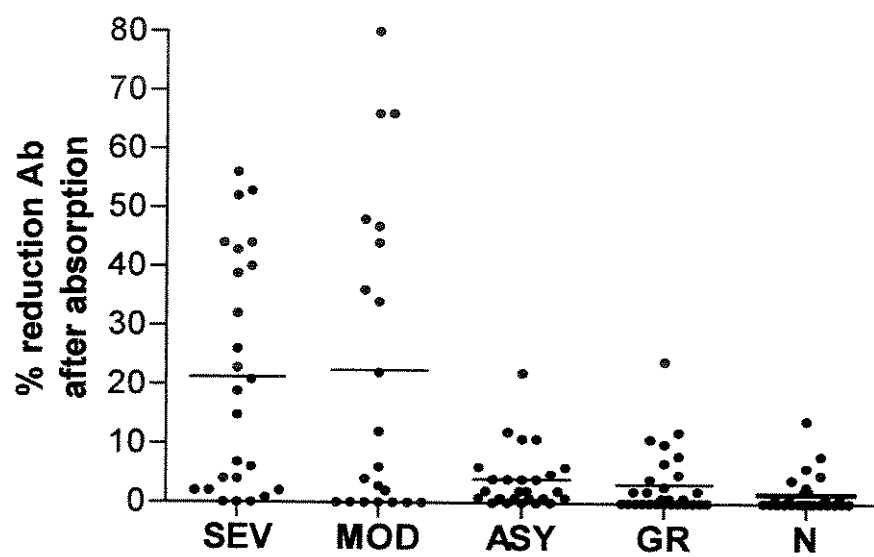


Figure 1.

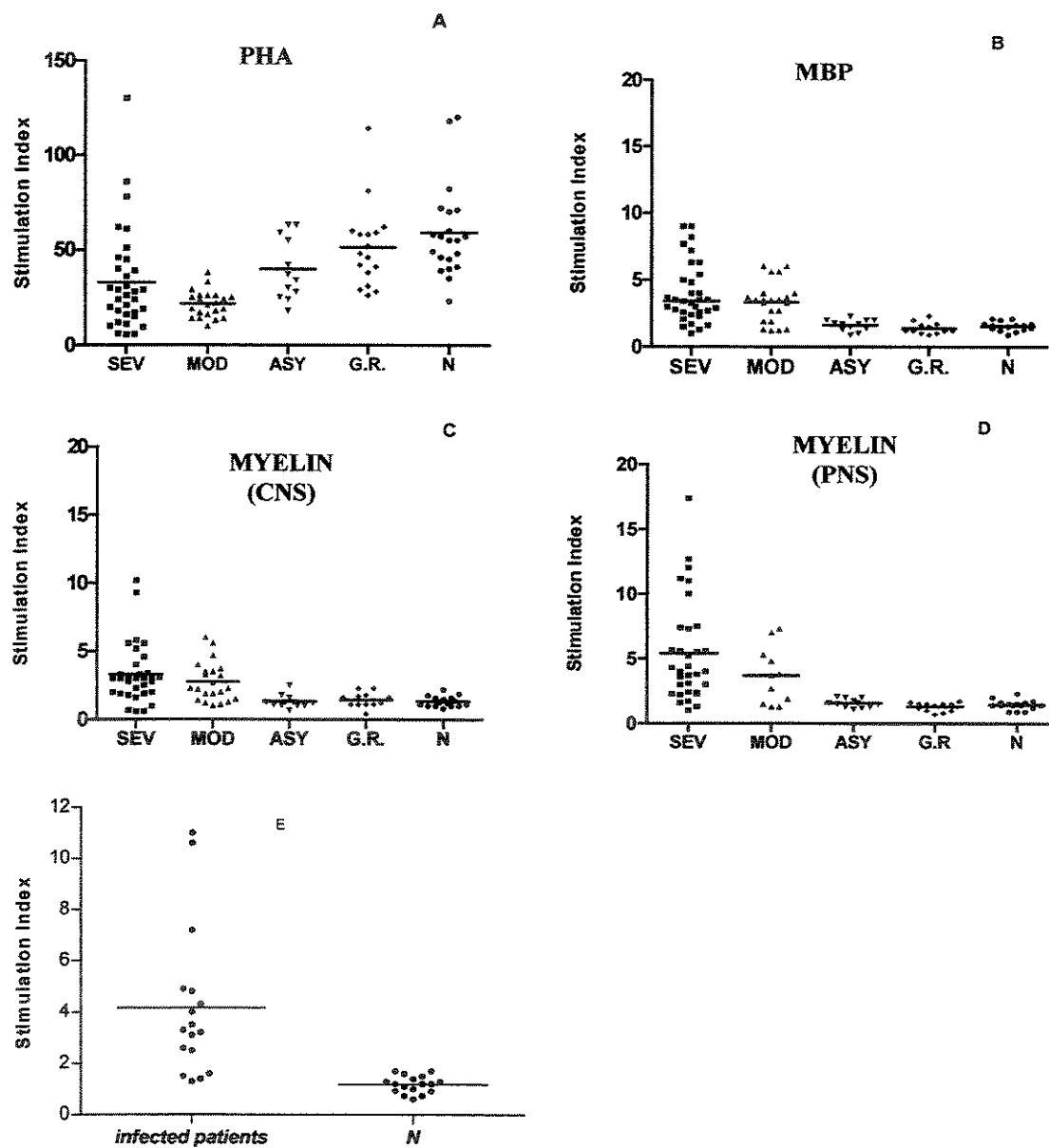


Figure 2.

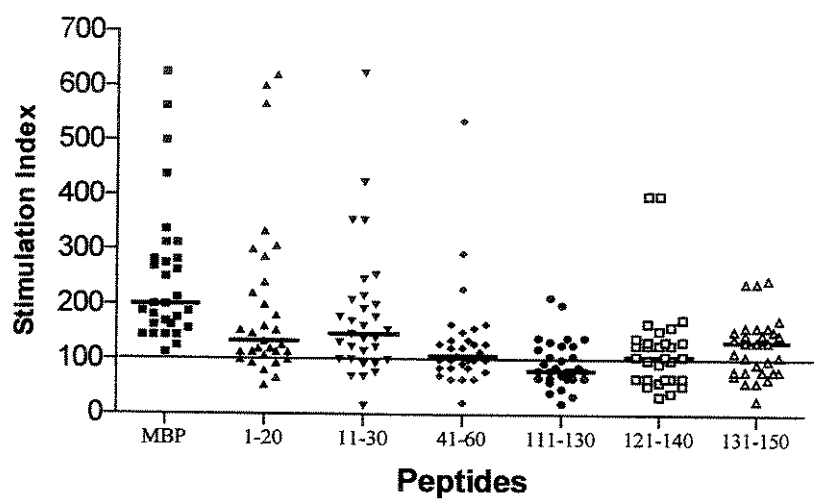


Figure 3.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Percentage of reduction of antibodies to myelin basic protein after appropriate absorption in the serum from patients with a digestive form of Chagas' disease SEV and MOD, as well as from asymptomatic patients (ASY), those exhibiting gastro-esophageal reflux (GR) and non-infected control individuals (N).

Figure 2. Proliferative response of lymphocytes from patients with gastrointestinal form of Chagas' disease and control individuals stimulated with nonspecific mitogen and myelin antigen. Proliferative response of peripheral blood lymphocytes from patients with the digestive form of Chagas' disease (MOD and SEV), asymptomatic patients (ASY), and those with Gastro-esophageal reflux (GR) as well as healthy individuals (N) to PHA, myelin components, and *T. cruzi* soluble extract antigens.

Figure 3. Proliferative response of lymphocytes to peptides from human MBP molecule in patients with gastrointestinal Chagas' disease (MOD and SEV). The results are presented as a stimulation index, which is the index of each sample divided by the mean of the index of stimulation of normal individuals group for each peptide x 100.

Reference

- [1] Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:577-591.
- [2] Dias JC. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease a clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop* 1989;22:147-156.
- [3] Reed SG. Immunology of *Trypanosoma cruzi* infections. *Chem Immunol* 1998;70:124-143.
- [4] Higuchi ML. Chronic chagasic cardiopathy: the product of a turbulent host-parasite relationship. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1997;39:53-60.
- [5] Engman DM, Leon JS. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Trop* 2002;81:123-132.
- [6] Kierszenbaum F. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;37:1-11.
- [7] Leon JS, Engman DM. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. *Front Biosci* 2003;8:e315-e322.
- [8] Nitz N, Gomes C, de Cassia RA, et al. Heritable integration of kDNA minicircle sequences from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas disease. *Cell* 2004;118:175-186.

- [9] Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3541-3545.
- [10] Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest* 1996;98:1709-1712.
- [11] Rizzo LV, Cunha-Neto E, Teixeira AR. Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 1989;57:2640-2644.
- [12] Ribeiro-dos-Santos R, Rossi MA, Laus JSS, Savino W, Mengel J. Anti CD4+ abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* 1992;175:29-36.
- [13] Godsel LM, Wang K, Schodin BA, Leon JS, Miller SD, Engman DM. Prevention of autoimmune myocarditis through the induction of antigen-specific peripheral immune tolerance. *Circulation* 2001;103:1709-1714.
- [14] DeFaria CR, de Rezende JM, Rassi A. [Peripheral denervation in the various clinical forms of Chagas' disease]. *Arq Neuropsiquiatr* 1988;46:225-237.
- [15] Zucoloto S, de Rezende JM. Mucosal alterations in human chronic chagasic esophagopathy. *Digestion* 1990;47:138-142.

- [16] Wood JN, Hudson L, Jessell TM, Yamamoto M. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasite. *Nature* 1982;296:34-38.
- [17] Said G, Joskowicz M, Barreira AA, Eisen H. Neuropathy associated with experimental Chagas' disease. *Ann Neurol* 1985;18:676-683.
- [18] Al-Sabbagh A, Garcia CA, az-Bardales BM, Zaccarias C, Sakurada JK, Santos LM. Evidence for cross-reactivity between antigen derived from *Trypanosoma cruzi* and myelin basic protein in experimental Chagas disease. *Exp Parasitol* 1998;89:304-311.
- [19] Norton WT, Poduslo SE. Myelination in rat brain: Method of myelin isolation. *J Neurochem* 1973;21:749-757.
- [20] Norton WT, Cammer W. Isolation and characterization of myelin. In: Pierre Morell, ed. *Myelin*. second edition ed. New York: Plenum Press; 1984.
- [21] Deibler GE, Martenson RE, Kies MW. Large scale preparation of myelin basic protein from central nervous tissue of several mammalian species. *Prep Biochem* 1972;2:139-165.
- [22] Corsini AC, Costa MG, Oliveira OL, Camargo IJ, Rangel HA. A fraction (FAd) from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes depresses the immune response in mice. *Immunology* 1980;40:505-511.
- [23] Garcia CA, Oliveira EC, Sakurada JK, Santos LM. Protective immunity induced by a *Trypanosoma cruzi* soluble extract antigen in experimental Chagas' disease. Role of interferon gamma. *Immunol Invest* 2000;29:1-12.
- [24] Leon JS, Wang K, Engman DM. Myosin autoimmunity is not essential for cardiac inflammation in acute Chagas' disease. *J Immunol* 2003;171:4271-4277.

- [25] Whitaker JN. The Protein Antigens of Peripheral Nerve Myelin. *Ann Neurol* 1981;9:56-64.
- [26] Kierszenbaum F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:210-223.
- [27] Tibbetts RS, McCormick TS, Rowland EC, Miller SD, Engman DM. Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Immunol* 1994;152:1493-1499.
- [28] Levin MJ, Levitus G, Kerner N, et al. Autoantibodies in Chagas' heart disease: possible markers of severe Chagas' heart complaint. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990;85:539-543
- [29] Khoury EL, Ritacco V, Cossio PM, et al. Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin Exp Immunol* 1979;36:8-15.
- [30] Van Voorhis WC, Eisen H. Fl-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J Exp Med* 1989;169:641-652.
- [31] Van Voorhis WC, Schlekewy L, Trong HL. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the Fl-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:5993-5997.
- [32] Dos Reis GA. Cell-mediated Immunity in Experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology today* 1997;13:335-342
- [33] Correale J, de los Milagros Bassani Molinas. Time course of T-cell responses to MOG and MBP in patients with clinically isolated syndromes. *J Neuroimmunol* 2003;136:162-171.

- [34] Hontebeyrie-Joskowicz M, Said G, Milon G, Marchal G, Eisen H. L3T4+ T cells able to mediate parasite-specific delayed-type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. *Eur J Immunol* 1987;17:1027-1033.
- [35] d'Imperio Lima MR, Eisen H, Minoprio P, Joskowicz M, Coutinho A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J Immunol* 1996;137:353.-356.