

AUTO-IMUNIDADE NA DOENÇA DE CHAGAS: FATO OU FANTASIA? CAUSA OU CONSEQÜÊNCIA?

Em 1974, foi demonstrado que várias preparações antigênicas induzem imunidade protetora em camundongos desafiados com formas virulentas de *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas^{1 3 13}. Com todas, a amplitude da proteção foi de grau significativo, de modo a alimentar a esperança quanto à possibilidade de se obter uma vacina perfeita e eficaz para uso humano. Em 1974 Cossio e cols⁴ apresentaram pela primeira vez evidência sugerindo a ocorrência de auto-imunidade em pacientes chagásicos. Os soros de 24 entre 25 pacientes com cardiopatia chagásica crônica e de 19 entre 47 outros assintomáticos provenientes de uma área endêmica, todos com sorologia positiva para doença de Chagas, continham anticorpos que reagiam com endocárdio, interstício e vasos sanguíneos do coração (anticorpos EVI), demonstrados pela imunofluorescência indireta. Os anticorpos EVI não foram encontrados nos soros de indivíduos normais e nem de pacientes com cardiopatia não-chagásica. Os anticorpos EVI foram prontamente absorvidos pelas formas epimastigotas do parasito cultivadas, sugerindo certo grau de reação imunológica cruzada entre o parasito e os tecidos do hospedeiro. Também sugere reação cruzada de *T. cruzi* com antígenos do hospedeiro, a absorção de imunoglobulinas autólogas eluidas de depósitos ocorrendo em músculo esquelético de pacientes com cardiomiopatia chagásica ativa pelas formas epimastigotas de *T. cruzi* ou por miocárdio humano ou de animais⁴. Embora os parasitos cultivados absorvam os anticorpos EVI, o significado e a importância da aparente reação cruzada são um tanto incertos, visto que eritrócitos de cobaia e *Trypanosoma rhodesiense* também absorvem eficazmente e os anticorpos EVI foram encontrados no soro de alguns pacientes com calazar e malária^{10 11}, cujas patologias diferem daquela da doença de Chagas.

Também, na década de 70, investigadores da Universidade Cornell observaram que a imunização de coelhos com frações subcelulares de *T. cruzi* produzia linfócitos citotóxicos para células do coração e rins alogênicos⁸, sugerindo que antígenos do *T. cruzi*, induziriam imunidade celular auto-reativa. Nos anos subseqüentes apareceram observações adicionais sugerindo reatividade cruzada entre *T. cruzi* e antígenos tissulares do hospedeiro^{12 14}, reforçando a noção de que a auto-imunidade poderia contribuir para o desenvolvimento das lesões chagásicas. No mesmo sentido, pode-se mencionar o recente achado no sangue de pacientes chagásicos agudos e crônicos de linfócitos T aparentemente citotóxicos para células

AUTO-IMMUNITY IN CHAGAS' DISEASE: FACT OR FANCY? CAUSE OR CONSEQUENCE?

By 1974, a number of antigenic preparations had been shown to induce protective immunity in mice against challenge with virulent forms of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease^{1 3 13}. In each case, the extent of protection was of a significant magnitude and encouraged hopes for the eventual development of a perfected, effective vaccine for human use. It was in 1974, however, that Cossio and co-workers first reported evidence suggesting the occurrence of auto-immunity in chagasic patients⁴. The sera of 24 out of 25 patients with chronic Chagas' heart disease and 19 out of 47 asymptomatic patients from an endemic area, with positive chagasic serology, were found to contain antibodies that reacted with endocardium, interstitium and blood vessels of the heart (EVI antibodies) as demonstrated by indirect immunofluorescence. EVI antibodies were not found in the sera of either healthy individuals or patients with non-chagasic cardiovascular disorders. EVI antibodies were readily absorbed by cultured epimastigote forms of the parasite, suggesting a certain degree of immunological cross-reactivity between the parasite and host tissues. Also suggesting cross-reactivity of *T. cruzi* with host antigens was the observation that autologous immunoglobulin eluted from deposits occurring in skeletal muscle of patients with active chagasic cardiomyopathy was absorbed by either freeze-dried epimastigote forms of *T. cruzi* or cardiac muscle tissue of human or animal sources⁴. Although cultured parasites absorbed the EVI antibodies, the meaning and significance of the apparent cross-reactivity were somewhat unclear since guinea pig erythrocytes and *Trypanosoma rhodesiense* also were effective absorbants and EVI antibodies were detected in the serum of some patients with kala-azar or malaria^{10 11}, the pathologies of which are distinct from that of Chagas' disease.

Also in the mid-seventies, investigators at Cornell University reported that immunization of rabbits with subcellular fractions of *T. cruzi* lead to the production of lymphocytes cytotoxic for allogeneic heart and kidney cells⁸, suggesting that *T. cruzi* antigens could induce autoreactive cellular immunity. In subsequent years, additional observations suggesting cross-reactivity between *T. cruzi* and host tissue antigens were communicated^{12 14}, reinforcing the notion that auto-immunity might contribute to the development of chagasic lesions. Further adding to this notion, was the recent finding in the blood of acute and chronic chagasic patients of T lymphocytes apparently cytotoxic for parasitized and non-

cardíacas humanas¹⁴. Um estudo indicou a existência de determinantes antigênicos comuns a formas de cultura de *T. cruzi* e antígeno de gânglio radicular dorsal de rato, visto que um anticorpo monoclonal (chamado CE5) contra este ligou-se a antígenos do citoplasma de epimastigoto e da superfície de amastigoto¹⁵. O conjunto destes achados forneceu a base para o conceito de que a vacinação contra o *T. cruzi* pode realmente produzir respostas imunes aos antígenos do parasito, reagindo cruzadamente com antígenos dos tecidos do hospedeiro, causaria auto-imunidade, como se acredita que possa ocorrer na doença de Chagas. Compreensivelmente, houve diminuição do entusiasmo acerca do uso de uma vacina para ajudar no controle ou erradicação desta doença.

Daqui para adiante serão examinadas as principais falhas e enganos dos estudos mais importantes e que serviram de base para se estabelecer o conceito de que a auto-imunidade desempenha papel na patogenia da doença de Chagas. Não será feita nenhuma tentativa de rever exaustivamente a literatura sobre este assunto, pois isto já foi realizado com sucesso anteriormente⁷.

Há dúvidas se os supostos antígenos da reação cruzada são legítimos produtos do parasito. Assim os epimastigotos usados para absorver os anticorpos EVI⁴ e para os estudos de imunofluorescência com o anticorpo monoclonal CE5¹⁵ cresceram em meio contendo extratos de tecidos de cérebro e de coração. Uma vez que os epimastigotos podem incorporar componentes do meio², a localização do marcador fluorescente no citoplasma¹⁵ não exclui a possibilidade de que o anticorpo CE5 possa ter revelado componentes do meio ao invés de produto do parasito. A mesma reserva se aplica aos amastigotos de cultura em cuja superfície se liga o anticorpo CE5, pois os organismos crescem em meio suplementado com extratos de tecido cerebral.

De modo semelhante, alguns dos coelhos cujos linfócitos mostraram citotoxicidade para culturas primárias de células de coelho tinham sido imunizadas com frações de parasitos que cresceram em culturas de células de coelho e não se poderia excluir a possível presença de antígenos de células do hospedeiro na fração parasitária usada para imunizar os coelhos⁸. Quando os linfócitos testados foram obtidos de coelhos sobreviventes à infecção pelo *T. cruzi*, as possíveis consequências do uso de um sistema alogênico para detectar a citólise mediada por células não foram totalmente exploradas. Assim, não se pode excluir a ocorrência de condições de restrição genética governando a citólise mediada por células e o reconhecimento de um antígeno de células alogênicas.

parasitized human heart cells¹⁴. A study supported the existence of antigenic determinants common to culture forms of *T. cruzi* and a rat dorsal root ganglion antigen since a monoclonal antibody (named CE5) raised against the latter bound to cytoplasmic epimastigote and surface amastigote antigens¹⁵. Collectively, these reports provided a basis for the concept that vaccination against *T. cruzi* might in fact elicit immune responses to parasite antigens that upon cross-reaction with host tissue antigens caused auto-immunity such as some believe might occur in Chagas' disease. Understandably, enthusiasm about the use of a vaccine to help control or eradicate this disease was diminished.

Examined here-after are the main deficiencies and pitfalls of the key studies on which the concept that auto-immunity plays a role in the pathogenesis of Chagas' disease rests. No attempt is made to exhaustively review the literature on this subject, as this has been ably done⁷.

Doubts have been raised as to whether the putative cross-reactive antigens are *bona fide* parasite products. Thus, the epimastigotes used to absorb the EVI antibodies⁴ and in the immunofluorescence studies with the CE5 monoclonal antibody¹⁵ had been grown in media containing brain and heart tissue extracts. Since epimastigotes can internalize medium components², cytoplasmic localization of the fluorescent stain¹⁵ does not rule out the possibility that the CE5 antibody may have detected a medium component rather than a parasite product. The same reservation applies to the cultured amastigotes to whose surface the CE5 antibody bound since the organisms had been grown in medium supplemented with a brain tissue extract.

Similarly, some of the rabbits whose lymphocytes displayed cytotoxicity on primary rabbit cell cultures had been immunized with fractions of parasites grown in rabbit cell cultures and the possible presence of host cell antigens in the parasite fraction used to immunize the rabbits was not ruled out⁸. When the tested lymphocytes were obtained from rabbits surviving infection with *T. cruzi*, the possible consequences of using an allogeneic system to detect cell-mediated cytotoxicity were not fully explored. Thus, it is conceivable that the genetic restriction conditions governing cell-mediated cytotoxicity and recognition of an allogeneic cell antigen might have occurred.

In the work in which peripheral blood lymphocytes from chagasic patients were found to display anti-heart cytotoxic activity *in vitro* there was a borderline but nevertheless statistically significant difference in the extent of ⁵¹Cr-release from radiolabeled fetal human heart cells produced by

No trabalho em que os linfócitos do sangue periférico de pacientes chagásicos exibiram *in vitro* atividade citotóxica anticoracão houve uma diferença pequena, porém estatisticamente significativa, na liberação de Cr51 de células fetais cardíacas humanas radiomarcadas, induzida por linfócitos de indivíduos chagásicos e de não-chagásicos¹⁴. Além do mais, a relativamente grande liberação de Cr51 (47 a 65%) produzida por linfócitos dos controles não chagásicos, causa preocupação quanto ao protocolo do teste de citotoxicidade usado no estudo.

Para complicar mais o assunto, alguns pesquisadores têm considerado a auto-imunidade como subsequente à produção de lesões chagásicas. Apóiam tal ponto de vista os resultados de Schmunis e cols⁹ mostrando que a quimioterapia eficiente leva à eventual negatização da sorologia anti *T. cruzi*, sem necessariamente haver queda dos anticorpos circulantes EVI. A perpetuação de anticorpos EVI no hospedeiro, na ausência de sorologia específica para o parasito, pareceria negar que o parasito é sua fonte comum de antígeno. Além do mais, a cinética do desenvolvimento das respostas imunes mediadas por células ao *T. cruzi* e neurônio ou antígenos cardíacos, avaliadas pelos testes de inibição de migração de macrófagos, é diferente⁶. Particularmente notável é a recente comunicação de Khoury e cols de que parte de seu trabalho original sobre anticorpos EVI não pode ser reproduzida⁵. Estes autores verificaram recentemente que os anticorpos EVI somente poderiam ser revelados pelo teste tradicionalmente usado da imunofluorescência indireta quando se utilizavam secções de tecidos animais. A incapacidade de reprodução dos resultados quando se usam tecidos humanos sugere a natureza heterófila dos anticorpos EVI e enfraquece os argumentos sobre seu possível papel na patogenia da doença de Chagas.

Houve um interessante relato descrevendo reação imunológica cruzada entre a laminina, um antígeno ubíquo do tecido conjuntivo, e um antígeno de tripomastigotos e amastigotos do *T. cruzi*¹². Enquanto se aguarda a confirmação do achado por outros investigadores, não se apresentaram evidências para associá-lo com à patogenicidade do parasito.

Como se pode apreciar, há controvérsia não somente acerca da verdadeira existência de uma condição de auto-imunidade na doença de Chagas, mas, também, se a auto-imunidade fosse provada de modo convincente sobre a possível ordem dos eventos. Assim, a auto-reatividade poderia resultar de respostas imunes dirigidas contra antígenos liberados de tecidos lesados ou modificados pelo parasito, mas aos quais não haviam sido expostos previamente.

lymphocytes from chagasic and non-chagasic individuals¹⁴. Furthermore, and raising concerns about the protocol of the cytotoxicity assay used in the study, was the relatively large degree of ⁵¹Cr-release (47 to 65%) produced by lymphocytes from non-chagasic controls.

To further complicate the issue, some investigators have envisaged auto-immunity as subsequent to the production of chagasic lesions. Supporting this notion are the results of Schmunis and collaborators⁹ showing that successful chemotherapy lead to the eventual negatization of anti-*T. cruzi* serology but was not necessarily accompanied by a loss of circulating EVI antibodies. The perpetuation of EVI antibodies in the host in the absence of parasite-specific serology would appear to deny that the parasite is their common antigen source. Furthermore, the kinetics of development of cell-mediated immune responses to *T. cruzi* and neurone or heart antigens monitored by macrophage migration inhibition tests is dissimilar⁶. Particularly conspicuous has been the recent communication by Khoury and co-workers defining part of their original work on EVI antibodies as *irreproducible*⁵. These authors noted recently that EVI antibodies could be detected by the traditionally used indirect immunofluorescence test only when animal tissue sections were used. Failure to reproduce the results when human tissue was used suggested the heterophilic nature of the EVI antibodies and undermined contentions about their possible role in the pathogenesis of Chagas' disease.

There has been an interesting report describing immunological cross-reactivity between laminin, a ubiquitous connective tissue antigen, and an antigen on *T. cruzi* trypomastigotes and amastigotes¹². While this observation awaits confirmation by other investigators, no evidence has been presented to link it with the pathogenesis of the parasite.

As can be appreciated, there is controversy not only about the true existence of an auto-immune status conducive to Chagas' disease but also, if auto-immunity should be convincingly proven, about the possible order of events. Thus, autoreactivity might result from immune responses directed against previously unexposed antigens released from tissues damaged or modified by the parasite.

In closing, three thoughts should be expressed. If *T. cruzi* indeed shared epitopes with host tissues, the development of a vaccine would demand careful selection of a highly purified parasite antigen lacking cross-reactivity – the convincing demonstration of which would amount to a virtually endless task. If, instead, auto-immunity resulted from exposing the

Para terminar, três raciocínios devem ser formulados. Se na verdade o *T. cruzi* compartilha epitopos com os tecidos do hospedeiro, o desenvolvimento de uma vacina demandaria cuidadosa seleção de um antígeno parasitário altamente purificado e que não apresentasse reatividade cruzada, cuja demonstração convincente seria uma tarefa virtualmente sem fim. Se, ao invés, a auto-imunidade resulta da exposição do sistema imune a antígenos previamente abrigados ou de tecidos modificados, a vacinação contra o *T. cruzi* pode prevenir a infecção e a auto-imunidade. Por outro lado, se a auto-imunidade for excluída ou comprovado que não contribui para a patogenia da doença de Chagas, o desenvolvimento da vacina seria um objetivo válido a ser perseguido. Para esclarecer estes pontos é essencial abandonar atitudes preconcebidas e manter a mente aberta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brener Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Advances in Parasitology* 18: 247-292, 1980.
2. Breña A, O'Daly JA. Uptake of fetal proteins by *Trypanosoma cruzi*. Immunofluorescence and ultrastructural studies. *International Journal of Parasitology* 6: 379-386, 1976.
3. Chagas C. Nova trypanomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo da *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1:159-218, 1909.
4. Cossio PM, Diez C, Szarfman A, Kreutzer E, Candiolo B, Arana RM. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation* 49:13-21, 1974.
5. Khoury EL, Diez C, Cossio PM, Arana RM. Heterophil nature of EVI antibody and *Trypanosoma cruzi* infection. *Clinical and Experimental Immunology* 27: 283-288, 1983.
6. Ribeiro dos Santos R, Hudson L. Denervation and the immune response in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Clinical and Experimental Immunology* 44:349-354, 1981.
7. Santos-Buch CA. Auto-immunity and Chagas' disease: demonstration of a common immunogen of heart and *Trypanosoma cruzi*. In: Miescher P, Bolis A, Gorini S, Lambo TA, Nossal GJV & Torrigiani G (eds) *First Symposium on Organ-specific Auto-immunity*, The Menarini Series on Immunopathology. Schwabe & Co, Basel pp. 101-119, 1978.
8. Santos-Buch CA, Teixeira ARL. The immunology of experimental Chagas' disease. III. Rejection of allogenic heart cells *in vitro*. *Journal of Experimental Medicine* 140:38-53, 1974.
9. Schmuñis GA, Cossio PM, Szarfman A, Coarasa L, Arana RM. Tissue-reacting antibodies (EVI antibodies) in Nifurtimox-treated patients with Chagas' disease. *Journal of Infectious Diseases* 138:401-404, 1978.
10. Szarfman A, Cossio PM, Diez C, Arana RM, Sadun E. Antibodies against endocardium, vascular structures and interstitium of striated muscle that cross-react with *T. cruzi* and *T. rhodesiense*. *Journal of Parasitology* 60: 1024, 1974.
11. Szarfman A, Khoury E, Cossio PM, Arana RM, Kagan, IG. Investigation of the EVI antibody in parasitic diseases other than American trypanosomiasis. An anti-skeletal muscle antibody in leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 24:19-24, 1975.
12. Szarfman A, Terranova VP, Rennard SI, Foidart J-M, Lima MDF, Scheinman, JI, Martin GR. Antibodies to laminin in Chagas' disease. *Journal of Experimental Medicine* 155:1161-1171, 1982.
13. Teixeira ARL. Immunoprophylaxis against Chagas' disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 93:243-280, 1977.
14. Teixeira ARL, Teixeira G, Macêdo V, Prata A. *Trypanosoma cruzi*-sensitized T-lymphocyte mediated ⁵¹Cr-release from human heart cells in Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27:1097-1107, 1978.
15. Wood JN, Hudson L, Jessell TM, Yamamoto M. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Nature (London)* 296:34-38, 1982.

Felipe Kierszenbaum
Department of Microbiology and Public Health
Michigan State University
East Lansing, Michigan 48824, USA