JOAQUIM XAVIER DE SOUSA JÚNIOR

**Avaliação da imunorreatividade contra
desmogleína 1 e *Trypanosoma cruzi* em
população de área endêmica
para pênfigo foliáceo**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Dermatologia
Orientadora: Profa. Dra. Valéria Aoki

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sousa Júnior, Joaquim Xavier de

Avaliação da imunorreatividade contra desmogleína 1 e *Trypanosoma cruzi* em população de área endêmica para pênfigo foliáceo / Joaquim Xavier de Sousa Júnior. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Dermatologia.
Orientadora: Valéria Aoki.

Descritores: 1. Pênfigo 2.Auto-anticorpos 3.Desmogleínas 4.Doença de Chagas 5.Auto-imunidade 6.*Trypanosoma cruzi*

USP/FM/DBD-194/12

DEDICATÓRIA

A meus pais Joaquim Xavier e Maria Claudina, responsáveis pela minha formação em geral.

A meu tio Toinho (*in memoriam*) e a minha família, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me colocar no lugar certo, na hora certa ao longo da minha trajetória de vida, e me manter sempre firme diante dos obstáculos.

Aos meus queridos pais, Joaquim Xavier de Sousa e Maria Claudina Rocha de Sousa, não poderia superar desafios sem o amor incondicional, apoio, educação e exemplo de vida dos meus pais.

À minha família (irmãos e irmã, cunhadas, sobrinhos e sobrinha, tios e tias, primos e primas), pelo carinho e por me acompanharem, mesmo à distância, nessa caminhada.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Valéria Aoki, um exemplo de ser humano, inteligente e humilde, admirada por todos os colegas que conheço; tive a sorte de tê-la como minha anfitriã na pesquisa dos pênfigos, no Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas-FMUSP.

À equipe de médicos do Departamento de Dermatologia da USP, pelo exemplo de profissionalismo e amor ao ensino.

Ao grupo do Ambulatório das Bolhas, representado pelas Profas. Dr^a. Celina Maruta e Dr^a. Cláudia Santi, onde o aprendizado, ensino e ciência são uma constante.

Aos funcionários do Departamento de Dermatologia e do Laboratório de Imunopatologia Cutânea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo auxílio e colaboração neste trabalho e na minha formação profissional.

À minha amiga e primeira orientadora Prof^a. Dr^a. Semíramis Jamil Hadad do Monte, por me apoiar e dar suporte desde minha iniciação científica e apostar no meu futuro.

Ao meu amigo Prof. Dr. Adalberto Socorro Silva, sempre disposto a ajudar e a ensinar tudo que sabe.

Aos meus amigos dos grupos de Clínica Médica e Dermatologia do HC-FMUSP, compartilhando alegrias e tristezas, superando desafios.

Aos amigos das várias especialidades do Hospital das Clínicas, por sempre me ajudarem nas dúvidas interdisciplinares.

Aos meus amigos e colegas da Universidade Federal do Piauí, em especial, Ana Maria, André, Fabrício, Itapuan, Lia e Lorena, meus companheiros de formação e amigos para sempre.

Aos meus amigos do Diocesano, em especial, Aurélio, Felipe, Flávia, José Augusto e Sérvulo: não existe distância para verdadeira amizade.

Às Dr^a. Denise Miyamoto e Dr^a. Livia Delgado, pela ajuda fundamental na confecção deste trabalho.

Às famílias que participam e/ou participaram da minha vida nessa caminhada: Admoni, Aires, Área Leão, Barros Carvalho, Brasil, Chaves, do Monte, Dourado, Ibiapina Reis, Galiza, Imanari, Januário, Matsumoto, Medeiros, Nader, Nishio, Noriega, Porfírio.

Aos indígenas da Aldeia de Limão Verde, pela contribuição imensurável no trabalho.

Ao Grupo Cooperativo de Estudos sobre o Fogo Selvagem, pelo apoio incondicional no trabalho.

Ao Hospital das Clínicas e à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por me capacitar para novos desafios.

*“Se consegui ver mais longe
é porque estava aos ombros de gigantes”*

Sir Isaac Newton

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	23
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3.1 A Adesão Celular.....	25
3.2 Imunopatogenia do PFE.....	28
3.2.1 Auto-anticorpos e PFE	28
3.2.2 Desmogleína 1 e PFE	30
3.2.3 Participação de Outras Classes de Imunoglobulinas no PFE...	32
3.2.4 PFE e Acantólise.....	33
3.3 Aspectos genéticos e PFE	34
3.4 Fatores Ambientais.....	37
3.4.1 Geoepidemiologia do Fogo Selvagem	38
3.4.2 Vetores hematófagos e FS	39
3.5 Doença de Chagas.....	42
3.5.1 O agente etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
3.5.2 Os vetores: Triatomíneos	43

3.5.3 Formas Clínicas da Doença de Chagas	46
3.5.4 Doença de Chagas nas Populações Indígenas	48
3.5.5 Patogênese Doença de Chagas	50
4. MÉTODOS	54
4.1 Área do estudo	54
4.2 Seleção de Pacientes.....	56
4.3 Ensaios Sorológicos	56
4.3.1. Técnica de ELISA utilizando a desmogleína 1 recombinante ..	57
4.3.2 Técnica de ELISA com antígenos de epimastigotas (<i>T. cruzi</i>) .	58
4.3.3 Imunofluorescência indireta para Doença de Chagas	59
4.3.4 TESA-Blot.....	61
5. RESULTADOS.....	66
6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÕES	83
8. ANEXOS	84
9. REFERÊNCIAS.....	95

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática dos componentes moleculares dos desmossomos. DP: desmoplaquina; Dsg1: desmogleína 1; Dsg3: desmogleína 3; PG: placoglobina; PP: placofilina. (Adaptado de Rook's Textbook of Dermatology, 2010, 8th Edition)26
- Figura 2. Localização da Aldeia de Limão Verde no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. (Adaptado de Hans-Filho et al, J Invest Dermatol. 1996;107:68-75)38
- Figura 3. Ciclo evolutivo do *T. cruzi* (adaptado de *Centers of Disease Control and Prevention* – www.dpd.cdc.gov/dpdx)43
- Figura 4. Representação esquemática da transmissão vetorial e manifestações clínicas da doença de Chagas. (Adaptado de Rassi et al, *Lancet* 2010; 375: 1388–402)52
- Figura 5. Sorologia positiva (IgG) para *Trypanosoma cruzi* através da técnica de imunofluorescência indireta em indivíduo habitante de área endêmica de Pênfigo Foliáceo Endêmico (Fogo Selvagem). Titulação: 1: 640. (X200)69
- Figura 6. Distribuição dos anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* (anti-*T.cruzi*) e anti-desmogleína 1 recombinante (anti-rDsg1) em indivíduos sem Fogo Selvagem da região de Limão Verde, MS. Coeficiente de Pearson $r = -0,05$, $p > 0,05$ 70
- Figura 7. A: *Immunoblotting* com antígenos excretados/secretados de tripomastigotas (TESA blot), polipeptídeos reconhecidos por IgG (colunas 1 a 5) de indivíduos sem Fogo Selvagem (FS) de Limão Verde (LV). B: Colunas 1' e 2', controles positivo e negativo, respectivamente. Pacientes nas colunas 1, 2, 3, 4 e 5 foram

classificados como tendo forma indeterminada da doença de Chagas, reconhecendo uma banda entre 150- e 160- kDa (antígenos de fase crônica). Marcadores de peso molecular à esquerda: 205 kDa (miosina muscular cunicular); 116 kDa (galactosidase de *Escherichia coli*); 97 kDa (fosforilase muscular cunicular); 66kDa (albumina bovina).71

Figura 8. Familiares habitantes de Limão Verde com sorologia positiva para doença de Chagas.....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sorologia de Doença de Chagas e auto-anticorpos anti-desmogleína 1 em pacientes com Fogo Selvagem testados por ELISA	67
Tabela 2 - Perfil de doença de Chagas e auto-anticorpos anti-desmogleína 1 testados por ELISA em indivíduos sem Fogo Selvagem de Limão Verde, MS	68

RESUMO

Sousa, JX Jr. *Avaliação da imunorreatividade contra desmogleína 1 e Trypanosoma cruzi em população de área endêmica para pênfigo foliáceo* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2012.

Introdução: O pênfigo foliáceo endêmico (PFE) ou Fogo Selvagem (FS) é uma dermatose bolhosa autoimune com auto-anticorpos IgG patogênicos, principalmente da subclasse IgG4, direcionados contra epítomos da desmogleína 1 (Dsg1), uma glicoproteína desmossômica que desempenha papel na adesão celular da epiderme. Os auto-anticorpos ligam-se a domínios específicos da Dsg1, gerando acantólise (perda da adesão celular) através de mecanismos diversos, tais como sinalização intracelular de moléculas e impedimento estérico. A etiopatogenia do FS é multifatorial, apresentando interações entre fatores imunológicos, genéticos e ambientais. Em algumas regiões do Brasil, detectou-se alta prevalência de FS (3%), sugerindo importante participação de fatores ambientais como desencadeantes da resposta autoimune. Indivíduos saudáveis de áreas endêmicas de FS reconhecem epítomos não-patogênicos da Dsg1, e exposição a insetos hematófagos é um fator de risco para FS. FS e doença de Chagas compartilham algumas regiões geográficas, e anticorpos anti-Dsg1 foram detectados em doentes de Chagas. Na reserva indígena Terena

(Limão Verde), onde a prevalência de FS é alta, a população está exposta a picadas de simuliídeos, cimeciídeos e reduviídeos. Estes insetos podem atuar como vetores de doenças, bem como na imunomodulação do processo autoimune do FS. **Objetivos:** Nosso estudo teve como objetivos: 1- avaliar a frequência de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* em doentes de FS e na população saudável da área de alto risco para FS, habitantes da aldeia indígena de Limão Verde, Mato Grosso do Sul, Brasil; 2- avaliar a reatividade concomitante contra Dsg1 e *T. cruzi* nessa população de alto risco para FS. **Métodos:** Realizamos ensaio sorológico de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) para reatividade contra Dsg1 e contra *T. cruzi* em 40 doentes de FS e em 150 indivíduos saudáveis da reserva indígena Terena. Adicionalmente, todos os soros foram analisados através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) para doença de Chagas. Nas reações positivas por ELISA e IFI para Chagas, TESA (*trypomastigote extracted/secreted antigens*) immunoblotting foi realizado como teste confirmatório para doença de Chagas. **Resultados:** A forma indeterminada da doença de Chagas foi identificada através da reação contra o *T. cruzi* por ELISA, IFI e TESA-BLOT em cinco indivíduos de Limão Verde, que não apresentavam FS. Nenhum doente de FS da região estudada apresentou reatividade contra *T. cruzi*. O perfil de anticorpos anti-Dsg1 evidenciou resultado positivo em 15 dos 40 doentes de FS e em 33 dos 150 soros de indivíduos saudáveis da região endêmica de FS. Não se observou reação cruzada entre doença de Chagas e FS. **Conclusões:** 1-Nosso estudo revelou pela primeira vez a ocorrência de doença de Chagas, forma

indeterminada, em uma população ameríndia Terena da aldeia de Limão Verde, uma área endêmica de fogo selvagem; 2-Nenhum doente de fogo selvagem da reserva indígena Terena de Limão Verde, Aquidauana (MS) apresentou reatividade contra o *Trypanosoma cruzi*; 3-A resposta anti-desmogleína 1 nos doentes de fogo selvagem foi encontrada em 37,5% (15/40) dos pacientes. Auto-anticorpos anti-desmogleína 1 nos indivíduos sadios (sem fogo selvagem) foram encontrados em 22% (33/150) dos casos. 4-Não houve concomitância de doença de Chagas e fogo selvagem na amostra populacional estudada de Limão Verde.

Descritores: 1.Pênfigo 2.Auto-anticorpos 3.Desmogleínas 4.Doença de Chagas 5.Auto-imunidade 6.*Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

Sousa, JX Jr. *Evaluation of immunoreactivity against desmoglein 1 and Trypanosoma cruzi in population from endemic area for pemphigus foliaceus* [thesis]. São Paulo : Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2012.

Introduction: Endemic pemphigus foliaceus (EPF) or Fogo Selvagem (FS) is an autoimmune blistering disorder with pathogenic IgG autoantibodies, mainly of the IgG4 subclass, that recognize desmoglein 1 (Dsg1), a desmosomal glycoprotein that plays a role in epidermal cell adhesion. Autoantibodies binding to specific domains of Dsg1 lead to acantholysis through different mechanisms, such as intracellular molecular signaling and steric hindrance. Etiopathogenesis of FS is multifactorial, with the interaction of immunological, genetic and environmental factors. In certain settlements of Brazil, a high prevalence of FS (3%) is reported, suggesting an important role for environmental factors as triggers of the autoimmune response. Healthy individuals from endemic areas recognize non-pathogenic epitopes of Dsg1, and exposure to hematophagous insects is a risk factor for FS. Interestingly, FS and Chagas disease share some geographic sites, and anti-Dsg1 has been detected in Chagas patients. In the Terena reservation of Limão Verde, where FS prevalence is high, the population is prone to insect

bites (*Simulium*, *Cimex* and *Triatoma*). Those insects may play a role as disease vectors or exert modulation of the autoimmune process in FS. **Aims:** Our study aimed: 1-To evaluate the frequency of antibodies anti-*Trypanosoma cruzi* in FS patients and in a healthy population living in a high-risk area for FS, a native Brazilian reservation of Limão Verde, Mato Grosso, Brazil; 2-To analyze the concomitant reactivity against Dsg1 and *T. cruzi* in a high-risk population for FS. **Methods:** We performed ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) for Dsg1 and *T. cruzi* in forty FS patients and 150 healthy individuals living in the Terena reservation. All sera were also analyzed by indirect immunofluorescence (IIF) for Chagas disease. In those seropositive reactions for *T. cruzi*, TESA (trypomastigoste extracted/secreted antigens) immunoblotting was performed as a confirmatory test for Chagas disease. **Results:** Indeterminate Chagas disease was identified utilizing ELISA, IIF and TESA-BLOT for *T. cruzi* in five non-FS individuals from Limão Verde. In counterpart, none of the FS patients living in the same geographic region showed reactivity against *Trypanosoma cruzi*. Anti-Dsg1 antibodies were present in 15 out of 40 FS sera and in 33 out of 150 sera from healthy individuals from endemic FS site. No cross-reactivity between Chagas disease and FS was observed. **Conclusions:** 1- Our study revealed, for the first time, the occurrence of indetermined Chagas disease in an Amerindian Terena population of Limão Verde, Aquidauana, an endemic area of Fogo Selvagem; 2-None of the FS patients from the present endemic focus of Limao Verde, Aquidauana (MS) showed reactivity against *Trypanosoma cruzi*; 3-The anti-Dsg1 response in FS patients of this focus was detected in

37.5% (15/40) of the patients. In non-FS controls, autoantibodies anti-Dsg 1 were detected in 22% (33/150) of the sera; 4-There was no concomitance of Chagas disease and fogo selvagem in the analyzed population of Limão Verde.

Descriptors: 1.Pemphigus 2.Auto-antibodies 3.Desmogleins 4.Chagas Disease 5.Autoimmunity 6. *Trypanosoma cruzi*

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O termo “pênfigo” é de origem grega, derivado da palavra “pemphix” que significa bolha, sendo utilizado na Dermatologia desde 1791 (Schmidt *et al* apud Waschke, 2008). É designado para as dermatoses bolhosas autoimunes intra-epidérmicas, nas quais ocorre o processo de acantólise (perda da adesão celular).

Os pênfigos são divididos em dois grupos principais: pênfigo vulgar (PV) e pênfigo foliáceo (PF). Existem variantes clínicas, como o pênfigo vegetante, variante do PV; o pênfigo eritematoso endêmico, para o PF, e o pênfigo droga-induzido, que pode se apresentar como PV ou PF. Novas variantes foram descritas: pênfigo por IgA, pênfigo paraneoplásico e pênfigo herpetiforme. Em virtude das apresentações distintas, acredita-se que o pênfigo tenha um caráter espectral, onde a característica comum em todas variantes é o surgimento de bolhas, associadas à ligação de auto-anticorpos a antígenos específicos da epiderme (Culton *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 1999).

O pênfigo foliáceo apresenta-se como dermatose bolhosa autoimune que poupa mucosas, e que se caracteriza pelo surgimento de bolhas superficiais, com sinal de Nikolsky positivo. São descritas as formas clássica e endêmica. A forma endêmica – Pênfigo Foliáceo Endêmico (PFE) – é também conhecida como Fogo Selvagem (FS), e sua ocorrência em

determinadas regiões do Brasil tem sido importante para elucidação da etiopatogenia desta enfermidade, com ênfase nos fatores ambientais atuando no seu desencadeamento.

O FS possui etiopatogenia multifatorial com inter-relação de fatores genéticos, imunológicos e ambientais. Indivíduos geneticamente predispostos podem produzir anticorpos direcionados contra auto-antígenos a partir de desencadeantes ambientais.

Atualmente, nossos estudos sobre o Fogo Selvagem estão concentrados na região do Mato Grosso do Sul, em uma reserva indígena Terena. As características epidemiológicas peculiares deste foco nos tem permitido avaliar, ao longo dos anos, os fatores que poderiam contribuir para o desencadeamento da doença (Hans-Filho et al., 1996).

Na reserva indígena Terena, os habitantes estão sujeitos a diversos estímulos ambientais, destacando-se a ocorrência de insetos hematófagos como simulídeos, cimecídeos e reduvídeos. Estes insetos, através de picadas, podem atuar como vetores para doenças bem como introduzir moléculas provenientes das glândulas salivares que teriam importante papel na modulação imune em indivíduos geneticamente predispostos a doença autoimune (Aoki , 2004).

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a participação de estímulos ambientais, destacando-se a reatividade contra o *Trypanosoma cruzi*, em população de risco para o pênfigo foliáceo endêmico (fogo selvagem).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- 2.1 Avaliar a frequência de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* em doentes com fogo selvagem e em população sadia exposta a vetores hematófagos habitantes da região endêmica para Fogo Selvagem (Aldeia Limão Verde, MS, Brasil).
- 2.2 Avaliar a reatividade contra desmogleína 1 concomitante à reatividade contra *Trypanosoma cruzi* em população de alto risco para o Fogo Selvagem (Aldeia Limão Verde, MS, Brasil).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A Adesão Celular

Os queratinócitos mantêm a adesão entre si através de estruturas glicoprotéicas, denominadas desmossomos (Dusek *et al.*, 2007). Os desmossomos organizam-se em um *core* central, constituído de glicoproteínas da superfamília das caderinas, moléculas de adesão cálcio-dependentes, sendo as desmogleínas e desmocolinas (Figura 1) os principais representantes deste grupo (Amagai, 1995; Waschke, 2008). As proteínas do *core* interagem com duas placas intracelulares, compostas por proteínas da família das plaquinas: placoglobina, desmoplaquina e placofilina (Getsios *et al.*, 2004).

A importância dos desmossomos na adesão celular é reforçada pelo achado desses complexos em células submetidas a estresse mecânico significativo, como o epitélio estratificado da pele e mucosas, bem como em células musculares cardíacas. Além disso, os desmossomos podem ser encontrados em epitélios simples e células não-epiteliais, como células meníngeas e células dendríticas reticulares de linfonodos (Waschke, 2008).

Figura 1. Representação esquemática dos componentes moleculares dos desmossomos. DP: desmoplaquina; Dsg1: desmogleína 1; Dsg3: desmogleína 3; PG: placoglobina; PP: placofilina. (Adaptado de Rook's Textbook of Dermatology, 2010, 8th Edition)

Em humanos, há quatro genes que codificam as desmogleínas, localizados no braço q do cromossomo 18 (Cowley et al., 1997). São identificadas como desmogleína 1, 2, 3 e 4. As desmogleínas 1 e 3 são restritas a tecidos com epitélio estratificado. Na epiderme, a desmogleína 3 (Dsg3) é encontrada nas camadas mais profundas, predominando na camada basal, enquanto a desmogleína 1 (Dsg1) é uma glicoproteína transmembranosa de peso molecular de 160 kD, distribuída ao longo da pele nas camadas granulosa, espinhosa e basal. A desmogleína 2 (Dsg 2) é encontrada em todos os tecidos com desmossomos, tanto nos epitélios simples (cólon, intestino delgado), quanto em tecidos não epiteliais como miocárdio e folículos linfonodais (Ishii, 2003; Whittock e Bower, 2003). A

desmogleína 4 (Dsg 4) foi descrita em 2003 (Whittock e Bower, 2003), e está distribuída nos folículos pilosos (Bazzi et al., 2006).

A desmogleína compartilha homologia com outros membros da superfamília das moléculas de adesão celular (MAC). As moléculas dessa família possuem cinco domínios extracelulares (EC1 a EC5). Os quatro primeiros domínios consistem em cerca de 110 aminoácidos altamente conservados, contendo seis sítios de ligação com cálcio; o quinto domínio extracelular (EC5), chamado de domínio extracelular de ancoragem (EA), localiza-se na região proximal à membrana, e possui características mais variáveis no tamanho e na sequência (Dusek et al., 2007; Puttagunta et al., 1994).

Na região amino-terminal do domínio EC1, foi descrita uma sequência de aminoácidos altamente conservada denominada sequência de reconhecimento de adesão celular (RAC). Modelos estruturais de ligação da desmogleína sugerem que a interação entre as moléculas ocorra através de resíduo de triptofano inserido em “bolso” hidrofóbico do domínio EC1. A ligação de peptídeos nessa região é suficiente para interferir com a ligação clássica homofílica entre caderinas (Getsios et al., 2004).

Estudos sobre a estrutura genômica da desmogleína 1 em bovinos determinam polimorfismo no domínio EC5, que difere da sequência do domínio EC5 encontrada na desmogleína 1 humana (Puttagunta et al., 1994). Ainda, anticorpos responsáveis pela ruptura da interação intercelular se ligam a epítomos denominados Decma 1 e ID734 localizados no domínio

EC5, sugerindo que esta região, assim como o domínio EC1, possui importância no mecanismo de adesão intercelular (Puttagunta et al., 1994).

3.2 Imunopatogenia do PFE

3.2.1 Auto-anticorpos e PFE

BEUTNER e JORDON (1964) demonstram pela primeira vez, através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI), a presença de anticorpos presentes no soro de doentes com pênfigo vulgar ligados ao epitélio. Neste estudo, oito dos 13 doentes avaliados apresentam anticorpos ligados ao estrato espinhoso da epiderme. A titulação em quatro indivíduos variou de 1:30 a 1:120 (Beutner e Jordon, 1964).

Em 1968, BEUTNER *et al* detectam, através da imunofluorescência indireta, anticorpos reativos contra a região intercelular do epitélio escamoso estratificado do esôfago e da pele em doentes de pênfigo foliáceo (Beutner et al., 1968). Os autores sugerem relação proporcional entre os títulos de auto-anticorpos intercelulares e gravidade da doença.

Estudos de transferência passiva de anticorpos de doentes de pênfigo foliáceo em camundongos BALBc revelam participação de anticorpos na patogênese da doença. Após injeção peritoneal de soro de doentes com pênfigo foliáceo com altos títulos de IgG, houve indução de bolhas cutâneas com características imunohistológicas e ultraestruturais de PF. Os títulos de IgG circulantes no soro dos camundongos injetados

mostraram correlação com a extensão da doença induzida (Roscoe et al., 1985).

Com relação às subclasses de IgG no FS, tanto no tecido, quanto circulantes, a subclasse predominante é a IgG4 (Rock et al., 1989). Auto-anticorpos das subclasses IgG1 e IgG2 foram detectados, mas em baixos títulos, e a subclasse IgG3 não foi detectada em nenhum paciente de FS.

O efeito patogênico do isotipo IgG4 dos doentes de FS é comprovado através de transferência passiva para camundongos BALBc, com indução de doença clínica, histológica e imunológica (Rock et al., 1989). Demonstra-se que a IgG4, bem como os fragmentos das frações F(ab')₂ e Fab' são capazes de induzir fogo selvagem em modelos murinos (Rock et al., 1990).

Em estudo de afinidade imunogênica de diferentes classes de auto-anticorpos no fogo selvagem, observa-se através de *immunoblotting* que IgG1 e IgG4 exibem bandas oligoclonais, com diferenças em relação ao pH. Os anticorpos da classe IgG1 se concentram na região básica, enquanto os anticorpos da classe IgG4 se distribuem ao longo de toda variação de pH. Este achado sugere que possa ocorrer uma resposta imunológica precoce do tipo IgG1. Os anticorpos da classe IgG1 passam por processo de mutação seletiva negativa, sendo seguidos pela produção mantida de anticorpos IgG4 (Calvanico et al., 1993).

Reforçando o papel das subclasses de IgG na patogênese do fogo selvagem, são analisados soros de doentes e de indivíduos saudáveis

nas regiões endêmicas. Os doentes possuem títulos de IgG 419 vezes maiores em relação aos indivíduos saudáveis. Doentes em remissão apresentam uma fraca resposta IgG4, 474 vezes menor do que os com doença ativa (Warren et al., 2003).

O seguimento de cinco indivíduos previamente saudáveis que evoluem com doença ativa permite documentar um aumento de 3,45 vezes nos títulos de IgG1, e de cerca de 103 vezes nos títulos de IgG4, quando do início da doença (Warren et al., 2003).

Esses estudos sugerem que a progressão da fase pré-clínica para fase clínica do FS, bem como a transição entre a remissão e a doença ativa estão associados ao fenómeno de transposição de classes de IgG1 para IgG4 (Warren et al., 2003).

3.2.2 Desmogleína 1 e PFE

STANLEY e colaboradores (1984), utilizando técnicas de imunoprecipitação, evidenciam que soros de pacientes com pênfigo reconhecem as moléculas da desmogleína 1 (Dsg1) e da desmogleína 3 (Dsg3)(Stanley et al., 1984). A seguir, EYRE e STANLEY (1987) descrevem a Dsg1 como o auto-antígeno do pênfigo foliáceo, tanto na sua forma clássica, quanto na sua forma endêmica (Eyre e Stanley, 1987).

EMERY *et al*, em 1995, mostram que a reatividade dos auto-anticorpos está direccionada ao domínio extracelular da desmogleína 1, e é IgG4-restrita e cálcio-dependente. (Emery et al., 1995).

Estudo em indivíduos saudáveis provenientes das áreas endêmicas de fogo selvagem identifica auto-anticorpos não patogênicos direcionados contra o domínio extracelular 5 (EC5) da desmogleína 1. Interessante notar que doentes de FS em fase pré-clínica também apresentam anticorpos que reconhecem epítomos da porção carboxila-terminal do domínio EC5 da Dsg1. Indivíduos sadios que passam a desenvolver lesões clínicas de fogo selvagem, produzem anticorpos patogênicos contra domínios EC1 e EC2, específicos para epítomos da região amino-terminal desses domínios (Li et al., 2003).

Esses achados sugerem que a resposta imune inicial no FS é direcionada contra epítomos do domínio EC5; em indivíduos geneticamente predispostos, surgem anticorpos direcionados contra epítomos dos domínios EC1 e EC2 da Dsg1 através de um mecanismo de *epitope spreading* intra-molecular (Li et al., 2003).

O *epitope spreading* é um fenômeno em que ocorre o desenvolvimento de resposta imune contra epítomos endógenos, secundária a liberação de auto-antígenos durante uma resposta inflamatória ou autoimune crônica (Vanderlugt e Miller, 1996). Este fenômeno pode ser encontrado em várias doenças cutâneas como pênfigo vulgar, pênfigo foliáceo, epidermólise bolhosa adquirida, penfigóide bolhoso, entre outras (Chan et al., 1998).

3.2.3 Participação de Outras Classes de Imunoglobulinas no PFE

O papel da IgG no PFE é incontestável. A participação de outras classes de imunoglobulinas no processo autoimune, entretanto, é descrito, e nos possibilita valorizar o papel do desencadeante ambiental na patogenia da enfermidade.

Analisando-se as imunoglobulinas produzidas na resposta imunológica de doentes com fogo selvagem em habitantes das áreas rurais adjacentes a áreas endêmicas, observa-se prevalência alta de anticorpos da classe IgM anti-desmogleína 1, em contraste com doentes de pênfigo foliáceo clássico e indivíduos saudáveis habitantes de áreas urbanas (Diaz et al., 2008).

Avaliando-se soro de neonatos de mães com FS, não foi detectada a presença de anticorpos IgM anti-Dsg1, sugerindo que a produção desses anticorpos ocorra após o nascimento, por sensibilização a provável fator ambiental (Rocha-Alvarez et al., 1992).

Essas observações soro-epidemiológicas sugerem que a exposição recorrente a fator(es) ambiental(ais) na região habitada poderia extrair uma resposta imune do tipo IgM não-patogênica (Diaz et al., 2008).

Estudo recente avalia a distribuição de anticorpos da classe IgE em doentes de FS (Qian et al., 2011). São observados níveis significativamente elevados de IgE em 81% dos doentes de FS do Brasil, quando comparados aos grupos controles de pênfigo foliáceo selecionados

dos Estados Unidos da América e do Japão. Através de regressão linear, identifica-se correlação entre a distribuição de IgE e IgG4 no grupo FS (correlação de Spearman $r=0,32$, $p<0,001$), sugerindo que a geração destes auto-anticorpos no FS é consequente à sensibilização associada a um alérgeno ambiental comum.

3.2.4 PFE e Acantólise

O mecanismo fisiopatológico da acantólise no pênfigo ainda não está completamente elucidado. A hipótese defendida seria de que a ligação de anticorpos a porções específicas da desmogleína comprometeria as interações do tipo *trans* entre os desmossomos intercelulares; assim, o processo de acantólise seria decorrente do impedimento estérico (*steric hindrance*) direto (Stanley e Amagai, 2006). Entretanto, investigações recentes propõem que o impedimento estérico não justifica todo o processo (Sharma et al., 2007).

WASCHKE *et al* (2005) propõem, através de sistema *in vitro*, que os anticorpos IgG no PF causam dissociação celular por vias de sinalização celulares, e não por impedimento estérico primário das interações *trans* da Dsg1 (Waschke et al., 2005).

A ativação de uma quinase, a p38 *mitogen-activated protein kinase* (p38MAPK) é um dos eventos precoces induzidos por anticorpos IgG no PF em modelos murinos. A inibição desta via bloqueia a capacidade de

anticorpos IgG de doentes de PF a induzirem lesões em modelos experimentais *in vivo* (Berkowitz et al., 2008).

JOLLY *et al* demonstram que a ligação de auto-anticorpos IgG de doentes com pênfigo vulgar (PV) à desmogleína 3 (Dsg3) provoca a sinalização intracelular, destacando-se a ativação de p38MAPK com posterior internalização de moléculas de Dsg3, contribuindo no processo de acantólise (Jolly et al., 2010).

Existem ainda estudos interessantes que demonstram outras condições dermatológicas infecciosas envolvendo a perda da adesão celular. A toxina exfoliativa produzida pela bactéria *Staphylococcus aureus*, responsável pelos casos de impetigo bolhoso e síndrome da pele escaldada, é uma serina-protease responsável pela clivagem da desmogleína 1 entre os domínios extracelulares 3 e 4 (EC3 e EC4). Esta clivagem parece ser a responsável pela inativação da adesão intercelular mediada por desmogleína 1 nas camadas superiores da epiderme (Amagai et al., 2000; Stanley e Amagai, 2006).

3.3 Aspectos genéticos e PFE

A influência de fatores genéticos na susceptibilidade para ocorrência de doenças autoimunes como o fogo selvagem pode ser observada através de estudos epidemiológicos, onde se registra maior prevalência em determinados grupos populacionais, bem como o surgimento de casos familiares nas populações avaliadas (Tron et al., 2005).

O padrão de herança genética relacionada ao fogo selvagem não obedece aos postulados clássicos de Mendel, havendo múltiplos genes que podem ter efeito isolado ou combinado, determinando a susceptibilidade à doença. Entre os genes associados a doenças autoimunes, incluindo o fogo selvagem, destacam-se aqueles que compõem o complexo principal de histocompatibilidade (MHC), também conhecido como *human leukocyte antigen* (HLA).

Estudos em populações homogêneas com o FS permitem reconhecer a importância de alelos do HLA classe II no processo; assim, no FS, há associação positiva com os alelos DRB1*0404, DRB1*1402 e DRB1*1406 em populações indígenas Terena. Em população indígena Xavante, encontra-se associação positiva do FS com os alelos DRB1*0404 e DRB1*1402. Nos mestiços com FS, verificando-se que o alelo com associação positiva para doença foi DRB1*01 (Cerna et al., 1993; Moraes et al., 1997).

Por outro lado, em uma população heterogênea de doentes de fogo selvagem, os seguintes alelos são relacionados à doença: DRB1*0101, *0102, *0103, *0404, *0406, *0410, *1406 e *1601 (associação positiva); DRB1*0301, *0701, *0801, *1101, *1104 e *1402 (associação negativa). Portanto, os alelos do *locus* HLA-DRB1 desempenham importante função de modulação para susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento do fogo selvagem (Pavoni et al., 2003).

Interessante notar que no estudo em populações indígenas Terenas e Xavantes, os alelos envolvidos na predisposição para

desenvolvimento do fogo selvagem compartilham a sequência de aminoácidos LLEQRRAA entre as posições 67-74, na terceira região hipervariável do gene DRB1 (Moraes et al., 1997). Esta mesma região está associada a outras doenças autoimunes, como a artrite reumatóide. A posição 71 em especial parece induzir alterações na especificidade de ligação com o peptídeo, levando à susceptibilidade para artrite reumatóide (Hammer et al., 1995).

Acredita-se que posições formadas por determinados aminoácidos possam contribuir para diferenças funcionais entre os alelos, e que poderiam ser relevantes na patogênese do fogo selvagem, determinando se um alelo levaria à susceptibilidade ou proteção para surgimento da doença (Pavoni et al., 2003).

Outros genes não relacionados ao *locus* HLA têm sido implicados na patogênese do pênfigo foliáceo. MARTEL *et al* identificam polimorfismo na posição 809, na região que codifica o segundo domínio extracelular da desmogleína 1. Os pesquisadores sugerem epístase genética entre os genes HLA e o gene DSG1, onde a interação entre o alelo HLA-DRB*04 e o genótipo C/C de DSG1 levaria à maior susceptibilidade ao pênfigo foliáceo no grupo estudado (Martel et al., 2001). No pênfigo foliáceo endêmico, entretanto, a diversidade genética do gene DSG1 não é o principal fator para sua patogênese (Petzl-Erler e Malheiros, 2005).

As citocinas desempenham importante papel na resposta imune. O polimorfismo genético dessas moléculas pode influenciar o seu nível de produção no organismo. No FS, a variante 174G do alelo da interleucina 6

(IL6) está associada com a doença. Sugere-se que esta variante determinaria uma elevação dos níveis de IL6, com relevante participação nos processos estimulatórios das células B e T, bem como no processamento e na apresentação antigênica por células dendríticas (Pereira et al., 2004).

3.4 Fatores Ambientais

A ocorrência de fogo selvagem em determinados grupos populacionais, como nos índios Terena da Aldeia Limão Verde, no Mato Grosso do Sul, permite estudar fatores ambientais que poderiam influenciar no surgimento da doença (Aoki et al., 2004). Esta região é considerada um modelo de estudo de fogo selvagem, considerando-se a elevada prevalência de doentes em espaços geograficamente restritos e com baixo índice migratório (Figura 2).

Figura 2. Localização da Aldeia de Limão Verde no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. (Adaptado de Hans-Filho et al, J Invest Dermatol. 1996;107:68-75)

3.4.1 Geoepidemiologia do Fogo Selvagem

ARANHA-CAMPOS(1942) sugere que os locais com maior prevalência do FS estão situados entre os meridianos 60 a 40 a Oeste de Greenwich e entre os paralelos 15 e 24, compreendendo a região sul dos Estados da Bahia, Goiás e Mato Grosso do Sul, além dos Estados de Minas

Gerais e São Paulo. Há uma ocorrência maior de doentes nas altitudes entre 500 e 800 metros, sendo pouco frequente em altitudes abaixo de 400 m e acima de 1100 m (Aranha-Campos, 1942). AUAD descreve pacientes distribuídos em locais em altitudes entre 200 e 1100m (Auad, 1972).

Estudos observacionais permitem identificar que elevado número de pacientes com FS habitam áreas rurais ou em processo de ocupação, próximas a rios ou córregos (Aranha-Campos, 1942; Diaz et al., 1989). Há relatos de maior incidência de casos ao final da estação chuvosa, uma vez que aumenta a frequência de insetos na região. Além disso, a proximidade a rios e córregos facilita a exposição a picadas de insetos nesse grupo de indivíduos predispostos. No estudo de MINELLI (1976), entretanto, os doentes de FS predominam em regiões com menores índices pluviométricos (Minelli, 1976).

3.4.2 Vetores hematófagos e FS

ARANHA-CAMPOS (1942) sugere a relação entre FS e a presença de insetos hematófagos nos focos ou nas proximidades, devido à elevada frequência de simulídeos, cimecídeos, reduvídeos, ixodídeos e cloropídeos (Aranha-Campos, 1942). Em levantamento entomológico feito por AUAD (1972) na região de Goiás, nota-se 60% de simulídeos (“borrachudos”), 20% de culicídeos (pernilongos), 10% de reduvídeos (“barbeiros”), 6% de ixodídeos (carrapatos) e 4% de cimecídeos (percevejos) nas áreas de FS (Auad, 1972).

LOMBARDI *et al.* (1992) estudam fatores ambientais relacionados aos casos de FS internados em hospital de referência, e encontram associação estatisticamente significativa com picadas de simuliídeos (“borrachudos”) com *odds ratio* de 4,7 (Intervalo de Confiança 1,8-12,2 - IC-95% $p < 0,001$) (Lombardi *et al.*, 1992).

EATON *et al* (1998) avaliam a distribuição de diferentes espécies de simuliídeos na região endêmica de Limão Verde, e verifica que a espécie predominante é o *Simulium nigrimanum*. Observa-se alta densidade de *S. nigrimanum* nas áreas baixas das correntes do Córrego João Dias, sendo escassa na nascente e nos tributários (Córrego Dois Irmãos e Córrego João Leite). Ressalta-se que essa espécie não foi encontrada nas regiões circunvizinhas, onde não há relato de doentes de FS (Eaton *et al.*, 1998).

WARREN *et al* (2000) identificam reatividade contra Dsg1 em mais de 50% dos indivíduos saudáveis habitantes da região de Limão Verde. Os níveis de anticorpos e a frequência de resultados positivos entre indivíduos saudáveis é diretamente proporcional à proximidade da moradia a áreas altamente endêmicas na sub-região Limão Verde, MS (Warren *et al.*, 2000). Este achado sugere que o estímulo ambiental constante em uma região geográfica restrita poderia levar a perda de tolerância imunológica, e surgimento da doença em indivíduos geneticamente predispostos.

No estudo caso-controle de AOKI *et al* (2004), são analisadas as características de 30 doentes de FS, comparados a familiares saudáveis e a membros não-consanguíneos da comunidade indígena de Limão Verde; cerca de 60% dos doentes de FS e da comunidade de LV estão envolvidos

em atividades rurais. Em relação à moradia, salienta-se que a maioria dos doentes de FS vivem em habitações rústicas, com telhado feito de palha, paredes de adobe ou pau-a-pique, e piso de terra batida. O estudo mostra elevada frequência de cimécídeos (66%), e reduvídeos (50%) nas moradias dos doentes de FS, quando comparada aos controles. Os doentes de FS relatam picadas por simulídeos (87%), reduvídeos (60%) e cimécídeos (63%) com maior frequência do que nos grupos controles (Aoki et al., 2004).

Baseados na hipótese de que fatores ambientais, principalmente agentes hematófagos, seriam os desencadeantes da resposta imune no FS, DIAZ *et al.* (2004) estudam indivíduos acometidos por doenças transmitidas por vetores hematófagos, como leishmaniose cutânea, oncocercose e doença de Chagas, avaliando a presença de anticorpos anti-desmogleína 1 no soro desses doentes. Demonstram reatividade contra a Dsg1 em 43% dos doentes com leishmaniose cutânea, em 83% dos doentes com oncocercose e em 58% em doença de Chagas. Importante ressaltar que a resposta dos auto-anticorpos é restrita ao domínio EC5 não patogênico da Dsg1. Desse modo, sugere-se que componentes das glândulas salivares dos insetos hematófagos possam induzir resposta imune inicial no FS (Diaz et al., 2004).

ALMEIDA *et al.* (2008) realizam levantamento da fauna de triatomíneos em 56 municípios do Estado do Mato Grosso do Sul. Nesse estudo, detectam 12 espécies de triatomíneos relacionados com ambiente antrópico. *Triatoma sordida* é a espécie mais abundante, apresentando índice de infecção natural por *Trypanosomatidae* de 0,15%. As espécies

Panstrongylus geniculatus e *Rhodnius neglectus* mostram índice de infecção de 3,2% e 0,6%, respectivamente (Almeida et al., 2008).

3.5 Doença de Chagas

A doença de Chagas (Tripanossomíase americana) representa uma das grandes endemias brasileiras. Foi descrita em abril de 1909 por Carlos Chagas, que em um feito singular na história da Medicina, descreveu também o agente causal *Trypanosoma cruzi* e o vetor transmissor (triatomíneo, conhecido como “barbeiro”)(Chagas, 1909).

3.5.1 O agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado pertencente à ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae*. Sua morfologia é variável de acordo com o estágio evolutivo do ciclo de vida, entretanto apresentam sempre um flagelo e o cinetoplasto (DNA mitocondrial condensado). Quando presente na corrente sanguínea dos vertebrados, adquire a forma tripomastigota, forma alongada, com cinetoplasto arredondado, e o flagelo localizado na região posterior do parasito. Há uma forma altamente infectante denominada tripomastigota metacíclica presente no tubo digestivo dos vetores triatomíneos. A forma amastigota apresenta-se arredondada, com cinetoplasto em formato de bastão, anterior ao núcleo, e o flagelo é curto. Esta forma pode ser encontrada nos tecidos dos hospedeiros infectados. Por fim, a forma epimastigota é alongada, com cinetoplasto em

bastão, anterior ao núcleo, e o flagelo emerge lateralmente, tornando-se livre na porção anterior do parasito (Figura 3). Esta forma pode ser encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (Teixeira et al., 2006).

Figura 3. Ciclo evolutivo do *T. cruzi* (adaptado de *Centers of Disease Control and Prevention* – www.dpd.cdc.gov/dpdx)

3.5.2 Os vetores: Triatomíneos

Os triatomíneos apresentam ampla distribuição pela América Latina, havendo sobreposição com regiões endêmicas para doença de Chagas. A participação dos triatomíneos no ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* está estritamente relacionada à hematofagia de insetos adaptados a ecorregiões limitadas pelo paralelo 42° no Norte dos Estados Unidos e pelo paralelo 42° no Sul da Argentina. Na literatura atual, há 138 espécies de

triatomíneos agrupadas em 6 tribos e distribuídas em 19 gêneros (Teixeira et al., 2006).

A hematofagia representa o fator primário na biologia, distribuição e evolução dos triatomíneos (Lent e Wygodzinsky, 1979). O principal fator limitante para disseminação tanto do *T.cruzi* quanto dos triatomíneos é a disponibilidade de ferro (Fe^{++}) ligado a proteína heme, encontrado na molécula de hemoglobina (Teixeira et al., 2006).

Todas as espécies de triatomíneos são potenciais vetores do *T. cruzi*; entretanto, poucas espécies preenchem as condições necessárias para serem vetores efetivos da doença de Chagas em humanos : a) adaptação à vida em habitações humanas; b) alto grau de antropofilia; c) curto intervalo entre o repasto sanguíneo e a defecação; d) ampla distribuição geográfica (Lent e Wygodzinsky, 1979).

Na América Latina, as principais espécies vetores do *T.cruzi* são: *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859), *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911) e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835).

No Brasil, as espécies predominantes na transmissão da doença de Chagas são: *Triatoma infestans*, com ampla distribuição nas regiões sul, sudeste, centro-oeste e nordeste (em 2006 houve controle dessa espécie no ciclo de transmissão); *Panstrongylus megistus*, nas áreas litorâneas do nordeste e sudeste; *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata*,

distribuídos no semiárido do nordeste; e *Triatoma sordida*, nativa do cerrado (Almeida et al., 2008).

A endemicidade da doença de Chagas possui peculiar relação com as ações antrópicas (humanas) de transformação do meio, levando à domiciliação de várias espécies de triatomíneos (Araujo et al., 2009b), que possuem constituição genética capaz de se adaptar a novos ecótopos com temperatura, umidade e fontes alimentares diferentes. A construção de habitações propícias à colonização por triatomíneos ocorre durante ocupações humanas desorganizadas com habitações feitas de alvenaria, pau-a-pique, adobe, cobertas por palhas, constituindo um microambiente adequado à domiciliação dos triatomíneos (Guarneri, 2008).

Nas habitações, os triatomíneos se reproduzem em ambiente escuro e protegido, como fendas nas paredes, mobília, caixas com roupas e papéis antigos, atrás de calendários e fotos de parede, assim como materiais dos telhados das habitações (palhas, restos de madeira). Nesses locais, eles permanecem imóveis durante o dia, e à noite, buscam alimentação (Lent e Wygodzinsky, 1979).

Outro fator importante para aproximação dos triatomíneos no ambiente peridomiciliar e domiciliar, favorecendo a propagação do *T. cruzi* nesses ambientes, é a existência de animais que coabitam, ou estão próximos do homem (Gurtler et al., 1998) como cães, gatos, porcos, ratos, servindo de fonte de repasto sanguíneo essencial na evolução dos triatomíneos, que são insetos hematófagos por natureza. Há animais

silvestres como tatus, gambas, macacos, morcegos que são responsáveis pela manutenção do ciclo silvestre do *T. cruzi* (Teixeira et al., 2006).

ALMEIDA et al (2008) investigam a distribuição de 13.671 exemplares de triatomíneos em 56 municípios do Estado do Mato Grosso do Sul e detectam 12,4% no ambiente intradomicílio e 87,6%, no peridomicílio. Ressalta-se que espécies consideradas estritamente silvestres como, *Triatoma vandae* e *Triatoma baratai*, são encontradas no peridomicílio nesse estudo (Almeida et al., 2008).

As espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* e *Triatoma rubrofasciata* possuem grande capacidade de colonização do ambiente domiciliar, adquirindo importância singular no surgimento de casos da doença de Chagas (Rassi et al., 2010).

Durante as décadas de 50 e 60, verifica-se um elevado número de infecções por *T. cruzi*. Esse período coincidiu com o intenso processo de ocupação de áreas silvestres por atividade humana, e introduzindo o homem como hospedeiro no ciclo de vida do *T. cruzi*.

3.5.3 Formas Clínicas da Doença de Chagas

Doença de Chagas Aguda

Após o contato com o agente etiológico *T. cruzi*, os indivíduos podem sofrer infecção aguda de Chagas, e evoluir com quadro assintomático ou sintomático. A taxa de cura da infecção aguda varia de 50 a 80% dos casos (Rassi et al., 2010).

Os sintomas na fase aguda podem variar desde febre prolongada, mal-estar, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, até edema subcutâneo (localizado ou generalizado). É interessante notar, em alguns casos, os sinais clínicos de porta de entrada do *T. cruzi* na pele: o chagoma de inoculação; ou na membrana mucosa ocular, o sinal de Romaña (Rassi et al., 2010).

As mortes na fase aguda podem ocorrer em 5 a 10% dos casos sintomáticos, principalmente associadas a complicações como meningoencefalite, pneumonite e miocardite (Rassi et al., 2010).

Doença de Chagas Crônica

Entre 10 e 30 anos após a infecção inicial, alguns indivíduos podem desenvolver a forma crônica da doença de Chagas. Nesse grupo, pode-se identificar 60 a 70% de indivíduos que não apresentam sinais e sintomas clínicos da doença, porém apresentam anticorpos contra *T. cruzi* no soro, com eletrocardiograma normal, e exames radiológicos do tórax, esôfago e cólon normais. Esses indivíduos são classificados como portadores da forma indeterminada da doença de Chagas (Rassi et al., 2010).

Por outro lado, 30 a 40% dos pacientes com doença de Chagas crônica podem apresentar sintomas cardíacos, digestivos ou ambos, sendo distribuídos nas formas cardíaca, digestiva ou cardio-digestiva da doença de Chagas (Rassi et al., 2010).

A forma digestiva está presente em 10 a 15% dos doentes e pode apresentar-se como megaesôfago, megacólon ou ambos. Os sintomas no megaesôfago são: disfagia com odinofagia, dor epigástrica, ptialismo, regurgitação e nos casos avançados desnutrição. Estes doentes com megaesôfago possuem maior frequência de câncer de esôfago (Brandalise et al., 1985; Henry et al., 2007). O megacólon acomete o cólon sigmóide, reto e/ou cólon descendente, com sintomas de obstipação prolongada, distensão abdominal, e até mesmo oclusão intestinal devido a fecaloma ou vólvulo de sigmoide.

A forma cardíaca é a forma mais frequente da doença de Chagas crônica, acometendo 20 a 30% dos indivíduos que desenvolvem alterações no sistema de condução cardíaca, com bradiarritmias e taquiarritmias, alterações estruturais, como aneurismas apicais, podendo evoluir com insuficiência cardíaca, tromboembolismo e morte súbita. Entre as anormalidades detectadas no eletrocardiograma, o achado da combinação de bloqueio de ramo direito com bloqueio fascicular anterior esquerdo é típico da doença de Chagas cardíaca (Marin Neto et al., 1999).

3.5.4 Doença de Chagas nas Populações Indígenas

Historicamente, há diferenças na ocorrência de doença de Chagas entre as populações indígenas, fazendo-se distinção conforme a região ocupada pelas tribos. Particularmente, na América Latina, podemos identificar diferenças na epidemiologia da doença de Chagas entre a

Cordilheira dos Andes (terras altas) e a Planície Amazônica/Brasil (terras baixas). Na primeira, adquire caráter endêmico e na segunda, enzoótico (Coimbra, 1988).

ROTHHAMER *et al* (1985) estudam 35 múmias provenientes de quatro sítios arqueológicos que habitaram a região norte do Chile no período de 470 a.C até 600 d.C. Nas autópsias, constata-se síndrome de megacólon em nove, cardiomegalia em duas e megaesôfago em uma múmia, sugerindo a existência da doença de Chagas na região desde o período pré-colombiano (Rothhammer *et al.*, 1985).

No Brasil, FERNANDES *et al* (2008) avaliam a presença e a distribuição da infecção do *T. cruzi* em diferentes tecidos de uma múmia apresentando megacólon, proveniente da região de Minas Gerais (Fernandes *et al.*, 2008). Todas as amostras testadas foram positivas para DNA de *T. cruzi*, sugerindo que a doença de Chagas no Brasil também precedeu a colonização europeia (Fernandes *et al.*, 2008). Estudos de imuno-histoquímica identificaram formas amastigotas de *T. cruzi* em uma múmia peruana (Araujo *et al.*, 2009a).

Por outro lado, é interessante notar que estudos clínicos e soropidemiológicos nas tribos indígenas das regiões planas (Amazônia e Brasil) **não identificam infecção por *T. cruzi*** (Coimbra, 1988). BARUZZI *et al* (1971) pesquisaram tripanossomíase entre os índios Xingu, porém não detectam sintomatologia ou evidência parasitológica (Baruzzi *et al* apud Coimbra, 1988).

Avaliando os índios Asurini no Estado do Pará, MÜLLER(1982) encontrou resultados negativos (Müller apud Coimbra, 1988). Os grupos indígenas Suruí e Karitiana da região de Rondônia são submetidos a inquéritos soro-epidemiológicos e não são relatados casos positivos para doença (Coimbra, 1988).

Em 1992, COIMBRA JR *et al* estudam indígenas da tribo Xavante na região do Mato Grosso, habitantes da Reserva Pimentel Barbosa (52°W, 13°S), quanto à presença de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*. São testadas 168 amostras sanguíneas, mas não é detectada reatividade contra *T. cruzi* nos indivíduos testados (Coimbra Junior et al., 1992).

3.5.5 Patogênese Doença de Chagas

A forma aguda da doença de Chagas está associada à alta parasitemia e ao parasitismo tecidual no coração, no trato gastrointestinal e no sistema nervoso. As manifestações clínicas como linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia são marcadores da reação imune contra o parasito, podendo levar a exacerbação do dano tecidual (Marin-Neto e Rassi, 2012).

A forma crônica possui patogênese variável conforme o órgão acometido. A fisiopatologia do megaesôfago e megacólon é resultante do dano nervoso do plexo mioentérico, com consequente denervação dos órgãos. Acredita-se que o envolvimento direto da musculatura lisa seja um fator contribuinte para formação do megaesôfago e megacólon (Marin-Neto e Rassi, 2012).

A patogênese da doença cardíaca permanece incerta. Acredita-se que quatro mecanismos possam contribuir na patogênese da doença cardíaca crônica (Marin-Neto et al., 2007):

1. mecanismo neurogênico;
2. inflamação dependente de parasitas;
3. doença microvascular;
4. dano imune-mediado.

Estes mecanismos podem estar imbricados, predominando um ou outro, conforme as manifestações cardíacas observadas. Assim, as arritmias possuem importante substrato neurogênico, com disfunção autonômica associada a danos cardíacos estruturais. Além do mais, a doença microvascular pode potencializar esses efeitos, associada à reatividade anormal a estímulos vasodilatadores e vasoconstrictores em doentes chagásicos (Torres et al., 1995).

A literatura sugere que o dano miocárdico inexorável na fase crônica seria resultante de reação imune, onde a infecção cardíaca com *T. cruzi* corresponderia ao fator desencadeante de uma resposta autoimune (Marin-Neto et al., 2007; Tarleton et al., 1997).

Figura 4. Representação esquemática da transmissão vetorial e manifestações clínicas da doença de Chagas. (Adaptado de Rassi et al, *Lancet* 2010; 375: 1388–402)

4. MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Área do estudo

A reserva Limão Verde localiza-se a 25km da cidade de Aquidauana, na porção Noroeste do Estado do Mato Grosso do Sul, e a 160km da capital do Estado, Campo Grande a Oeste, entre os paralelos 20°18'22" S e 20°22'25" S e os meridianos 55°39'57"WGr e 55°42'33"WGr. Sua extensão é de 1712 hectares, compreendendo duas regiões denominadas Limão Verde e Córrego Seco. A região localiza-se a cerca de 230 metros de altitude, ocorrendo solo, relevo e clima com aptidão agrícola natural.

A região de Limão Verde (MS) é irrigada em grande extensão pelos Córrego João Dias e seus dois afluentes, Córrego Dois Irmãos e Córrego João Leite. A vegetação primitiva é o cerrado (savana), havendo substituição por agricultura de subsistência como milho, feijão, arroz, mandioca e cana-de-açúcar. O clima predominante é o tropical quente e sub-úmido com temperatura média de 24 °C. Há duas estações bem definidas, chuvosa e seca. A primeira ocorre de outubro a abril com índices pluviométricos mensais entre 1200 e 1400 mm e temperaturas diárias de 28 a 43 °C. Por outro lado, na estação seca, de maio a setembro, ocorrem temperaturas médias de 18 °C e precipitação pluviométrica menor que 50

mm e umidade relativa menor que 40%, sendo comum as queimadas (Hans-Filho, 1998).

A população da região de Limão Verde, segundo levantamento da FUNASA de 2005 é de 1.349 habitantes, distribuídos em 295 famílias. A maioria dos habitantes pertence a etnia Terena, um dos subgrupos dos índios Guaná, pertencente ao grupo linguístico Aruak, encontrando-se porém participação de tribos não-Terena (Xavantes, Bolivianos, etc) bem como outras etnias(brancos, negros, mestiços) na composição da população. A organização social Terena segue padrões tradicionais mantidos através de gerações, onde há um chefe (Cacique) eleito por voto popular a cada 5 anos, entretanto o poder político é compartilhado entre os membros que formam o Conselho da Tribo. Estão organizados em uma unidade familiar patriarcal, possuindo casa e parte de terra cultivável (Hans-Filho et al., 1996).

Existe uma divisão de atividades segundo o sexo: os homens sendo direcionados para agricultura (preparo da terra), e as mulheres são responsáveis pela sementeira, bem como comercialização dos produtos da agricultura e do artesanato da aldeia.

As doenças mais prevalentes nessa população são tuberculose, parasitoses intestinais e alcoolismo. A assistência médica na região é inconsistente, sendo necessária a transferência dos quadros clínicos mais sérios para cidade de Aquidauana ou Campo Grande. As crianças recebem imunizações financiadas pelo governo federal (Hans-Filho, 1998).

As habitações não possuem sistema de saneamento de água e esgoto; e são predominantemente feitas de adobe, sendo comum o achado de insetos (“barbeiros”, percevejos) dentro das moradias (Aoki *et al.*, 2004). Entretanto, tem ocorrido melhoria em algumas habitações, através de projetos de incentivo governamental, com a construção de moradias de tijolo e cimento. No ambiente peridomiciliar e domiciliar, encontram-se animais (cachorros, galinhas) criados livremente.

4.2 Seleção de Pacientes

Foi realizada coleta de 10 mL de sangue para pesquisa de auto-anticorpos anti-desmogleína 1 e sorologia para doença de Chagas. Foram incluídos 40 indivíduos com PFE e 150 indivíduos saudáveis habitantes de região endêmica de alta prevalência para o PFE. Os doentes de PFE atendiam aos critérios clínicos, histológicos e de estudos de imunofluorescência para o diagnóstico de pênfigo foliáceo. Todos os indivíduos foram informados sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP.

4.3 Ensaio Sorológicos

Todos os soros dos pacientes foram submetidos à técnica ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) para pesquisa da resposta a anti-desmogleína 1 e da resposta contra *T. cruzi* (MBL, Mesacup, Japan e

Biomérieux, França, respectivamente). Os soros também foram submetidos à imunofluorescência indireta (IFI) para doença de Chagas (Biocientífica SA, Argentina).

4.3.1. Técnica de ELISA utilizando a desmogleína 1 recombinante

1. Soros obtidos de indivíduos sadios são diluídos (1:100) para um volume final de 300 µl (solução diluente: Tris-HCl, BSA, CaCl₂).
2. Os soros são homogeneizados 3-4 vezes antes de serem incubados na placa de ELISA.
3. Incubação por 1 hora.
4. Lavagem automatizada por 4 vezes, com o tampão de lavagem do kit ELISA.
5. Incubação com o conjugado (anticorpo monoclonal murino anti-humano conjugado à horse-radish-peroxidase-HRP) por 1 hora.
6. Lavagem automatizada por 4 vezes, com o tampão de lavagem do kit ELISA.
7. Substrato (tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio: TMB/H₂O₂).
8. Solução bloqueadora (0,1 M ácido sulfúrico).
9. Leitura no espectrofotômetro (comprimento de onda: 450nm)

Interpretação dos resultados:

Dsg-1: <14=negativo; 14-20=duvidoso; >20: positivo

Cálculo dos resultados:

Unit value (U/mL)=(A450 amostra-A450 calibrador negativo)/(A450Dsg calibrador-A450 calibrador negativo)x100

4.3.2 Técnica de ELISA com antígenos de epimastigotas (*T. cruzi*)

1. Soros são diluídos (1:21) com diluente de amostras diretamente nas cavidades - 200 µl de diluente + 10 µl de amostra
2. Agitar a placa delicadamente para misturar a solução.
3. Cobrir a placa com adesivo e incubar por 30 minutos a 37°C.
4. Lavagem automatizada da placa 6 vezes com tampão de lavagem diluído. Remover todo excesso de tampão.
5. Incubação com 100 µl do conjugado por 30 minutos a 37 °C.
6. Lavagem automatizada da placa 6 vezes com o tampão de lavagem diluído. Remover todo excesso de tampão.
7. Incubação com 100 µl do conjugado cromogênico por 10 minutos na câmara escura.
8. Solução bloqueadora com 50 µl de ácido sulfúrico 2N. Agitar a placa suavemente. 9- Leitura com espectrofotômetro (comprimento de onda: 450nm)

Interpretação dos resultados:

Cálculo do *cut off*

Valor médio da absorbância dos controle negativos + 0,250

Determinação da absorbância das amostras / valor médio de *cut off* (A/C)

Índice A/C:

$A/C \geq 1,0$: reação positiva

$A/C < 0,8$: reação negativa

$0,8 \leq A/C < 1,0$: reação duvidosa

4.3.3 Imunofluorescência indireta para Doença de Chagas

1. Reconstituição do tampão salino fosfato (PBS) por diluição em 1 litro de água destilada, conservando-o entre 2-8 °C.
2. Preparação das diluições dos soros no PBS - diluição de screening: 1:40; diluições seriadas à metade para uma determinação semi-quantitativa.
3. Incubação das áreas reagentes com as amostras e os controles diluídos na câmara úmida 30 minutos à temperatura ambiente .
4. Lavagem com PBS, em duas etapas com duração de cinco minutos cada uma. Colocar as lâminas na jarra de Coplin contendo PBS, agitando suavemente durante as etapas de lavagem.

5. Diluir a anti-gamaglobulina total humana marcada com isotiocianato de fluoresceína no PBS.
6. Incubação de cada área reagente com a diluição de anti-gamaglobulina na câmara úmida 30 minutos à temperatura ambiente.
7. Repetir passo 4.
8. Adicionar Azul de Evans durante quatro minutos.
9. Lavar o excesso de corante com PBS.
10. Leitura em microscópio de imunofluorescência HBO 50w (Zeiss, Marburg, Alemanha)

Interpretação dos resultados

Critérios de leitura

Critérios para Reações Positivas:

No caso de soros positivos, os *Trypanosoma cruzi* são observados com uma coloração típica fluorescente verde maçã. A fluorescência é particularmente intensa na membrana e no flagelo do parasita.

Critérios para Reações Negativas:

- a) Ausência total de fluorescência
- b) Parasitas corados difusamente sem fluorescência de membrana

- c) Parasitas apresentando fluorescência no citoplasma e nas estruturas intra- citoplasmáticas em forma não homogênea
- d) Predomínio da coloração (fundo e antígeno róseos)

Titulação

O resultado informado é o da última diluição na qual se detecta a fluorescência verde maçã.

4.3.4 TESA-Blot

Obtenção dos componentes excretados/secretados por formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* (TESA = *Trypomastigote Excreted/Secreted Antigens*)

O antígeno excretado-secretado de formas tripomastigotas (TESA) *Trypanosoma cruzi*, cepa Y foi obtido de sobrenadante de cultura de células infectadas (Umezawa et al., 1996b). Após 48-72 h de infecção a monocamada de células LLCMK2 foi lavada 3 vezes com o meio de cultivo (RPMI) para retirar os parasitas que não penetraram. O sobrenadante celular foi coletado entre 1 a 4 dias após a última lavagem, quando continha no mínimo 5×10^6 formas tripomastigotas/ml. Em seguida foi centrifugado a 4.500 rpm, por 15 minutos a 4 °C, e filtrado através de membrana de acetato de celulose de 22µm (Millipore Co). Alíquotas foram armazenadas à temperatura de -70 °C até o momento do uso.

A dosagem protéica do TESA foi efetuada com alíquotas obtidas em meio RPMI sem SFB. A concentração protéica obtida de 40µg foi dosada pelo kit comercial que utiliza a técnica do ácido bicinconínico (Micro-BCA-PierceCo, Smith et al., 1985). Devido à interferência de proteínas presentes no SFB, não foi efetuada a dosagem protéica para o TESA obtido em meio contendo 2% SFB.

Preparo das amostras de TESA para eletroforese

A amostra de TESA, cepa Y, do *T. cruzi*, foi diluída vol/vol em tampão de amostra (160mM Tris HCl pH 6.8, 5% de SDS, 50mM de 2-mercaptoethanol, 20% de Glicerol e 0,02% de Azul de bromofenol) e fervidas a 100 °C por 5 minutos. Em seguida 300 µl foram aplicados no gel.

Marcadores de peso molecular foram adquiridos comercialmente (Sigma-High WM) e utilizados como padrões de peso molecular, que consistiam das seguintes proteínas: 66 kDa (Albumina bovina), 97kDa (Fosforilase B), 116kDa (Galactosidase) e 205kDa (Miosina).

Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os componentes protéicos do TESA foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS) (Laemmli, 1970).

A separação eletroforética das proteínas foi realizada em sistema de mini gel 8,5x5,0 cm (Bio-RadCo.), utilizando-se um gel de separação (Tris-HCl 300 mM pH 8,6; SDS 0,1%; Acrilamida 29,2%; N,N metileno bis

acrilamida 0,8%; Persulfato de amônia 0,03% e N,N,N,N-tetrametiletilenodiamida-Temed, 0,1%) na concentração de 7% e gel de empilhamento na concentração de 4%.

A corrida eletroforética foi efetuada utilizando-se tampão de corrida (Tris 75mM; Glicina 576mM, pH 8,64 e SDS 0,1%) com aplicação de corrente elétrica de 200V, por aproximadamente 40 minutos. A migração protéica foi monitorada pela visualização do corante azul de bromofenol, presente no tampão de amostra. As frações antigênicas, distribuídas pelo gel, foram visualizadas, coradas quimicamente ou transferidas eletroforeticamente para membranas de nitrocelulose (NTC) e visualizadas pelo immunoblotting.

Transferência eletroforética de proteínas

A transferência eletroforética, das proteínas separadas por SDS-PAGE, para membranas de nitrocelulose (NTC, de poro de 0,45, BioRadCo.) foi realizada de acordo com a técnica descrita por Towbin et al (1979). A transferência foi executada no sistema semi-seco (Semi-Phor TE 70 – Hoeffer Sc Instruments Co.), por 1 hora sob ação de uma corrente elétrica de $0,9\text{mA}/\text{cm}^2$ utilizando um tampão de transferência (Tris 25mM; Glicina 192mM e Metanol 20%, pH 8,3).

Immunoblotting

A eficiência da transferência das frações protéicas e a localização das proteínas do padrão de PM, nas membranas de nitrocelulose, foi realizada com o corante Ponceau (Ponceau-S, 0,2%, ácido acético 1%). A

região correspondente ao marcador do PM, corada com o Ponceau, foi localizada nas membranas, recortada e corada posteriormente com Amido black 0,1%. Após 20 segundos foi descorada com Ácido acético 7%. A membrana restante corada com Ponceau foi descorada com PBS. Posteriormente a membrana foi bloqueada com uma solução bloqueadora (leite desnatado a 5%, Molico-Nestlé) diluída em PBS, por 1 hora, a temperatura ambiente sob agitação constante.

A membrana bloqueada foi incubada com os soros diluídos em PBS contendo 1% de leite, por 2 horas, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após 5 lavagens (5 minutos) com PBS, a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG humano conjugado á peroxidase (Sigma Co.) diluídos 1:4.000 em PBS contendo 1% de leite, por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação. Após novo ciclo de lavagens em PBS, os imunocomplexos foram visualizados, por meio da adição de 500 µl de uma solução reveladora (6mg de 4-Cloro-naftol; 2ml de Metanol ; 10ml de PBS e 10 µl de H₂O₂). A reação foi interrompida por adição de água destilada, após o aparecimento das bandas. A membrana foi então lavada em água destilada e seca entre dois papéis de filtro. A documentação foi realizada por fotografias ou digitalizadas por um programa de computador.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Em relação aos dados demográficos, a distribuição segundo o gênero, foi de 55% de indivíduos do sexo masculino e de 45% do sexo feminino, com média de idade de 32 anos (variando de 12 a 76 anos de idade) no grupo dos doentes de FS. No grupo dos indivíduos sem fogo selvagem, 40,7% eram do sexo masculino e 59,3%, do sexo feminino; a idade nesse grupo variou de 4 a 92 anos, com média de 22,5 anos de idade.

Em 40 pacientes de FS habitantes de áreas endêmicas (ANEXO A) submetidos a sorologia para Chagas, nenhum indivíduo mostrou-se reativo contra antígenos de epimastigotas através do ELISA (“*cut-off*” 0,303, mediana de 0,304). Segundo as indicações do fabricante (**Biomerieux, França, lote 30215**), devem ser considerados positivos somente os valores acima de 1. Houve apenas um resultado indefinido (indivíduo 32) através da técnica ELISA, que resultou negativo na técnica de imunofluorescência indireta (IFI).

Para confirmação da sorologia para doença de Chagas, foi realizada imunofluorescência indireta (IFI) nesses 40 indivíduos, revelando-se negativa em todos os indivíduos desse grupo.

Em 150 indivíduos saudáveis habitantes de áreas endêmicas (ANEXO B), a sorologia para Chagas revelou 5 indivíduos reativos contra antígenos de epimastigotas através do ELISA (“*cut-off*” 0,303, mediana de

0,304). Segundo as indicações do fabricante (**Biomerieux, França, lote 30215**), devem ser considerados positivos somente os valores acima de 1.

Tabela 1 - Sorologia de Doença de Chagas e auto-anticorpos anti-desmogleína 1 em pacientes com Fogo Selvagem testados por ELISA

Fogo Selvagem (anti-rDsg1)	Doença de Chagas		
	Positivo	Negativo	Indefinido
Positivo	0	15	0
Negativo	0	24	1
Total	0	39	1

Legenda: anti-rDsg1 : anticorpos anti-Desmogleína 1 recombinante

Conforme a Tabela 1, entre os 40 doentes de FS, 25 (62,5%) não tiveram anticorpos anti-Dsg1 detectados no soro, e 15 (37,5%) apresentaram reação positiva para anti-Dsg1. Em relação a doença de Chagas nesse grupo, apenas um caso foi indefinido pela técnica de ELISA, os outros 39 resultaram negativos para reatividade contra *T. cruzi*.

Tabela 2. Perfil de doença de Chagas e auto-anticorpos anti-desmogleína 1 testados por ELISA em indivíduos sem Fogo Selvagem de Limão Verde, MS

Indivíduos sem-FS (anti-rDsg1)	Doença de Chagas	
	Positivo	Negativo
Positivo	0	33
Negativo	5	112
Total	5	145

Legenda: FS: Fogo Selvagem; anti-rDsg1: anticorpos anti-Desmogleína 1 recombinante.

No grupo dos indivíduos sem FS, dos 150 testados, 33 (22%) apresentaram reatividade contra desmogleína 1, por outro lado, em 117 (78%) não foram detectados anti-Dsg1 no soro. Detectou-se 5 (3,33%) indivíduos com reatividade a *T. cruzi* entre os 150 testados no grupo (Tabela 2).

Conforme orientação do Consenso Brasileiro de Doença de Chagas (2005), realizamos concomitantemente a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) para o diagnóstico de doença de Chagas, revelando-se também cinco resultados positivos, com as titulações que variaram de 1:320 a 1:640 (Figura 5). Entre os indivíduos positivos testados na IFI, detectou-se um indivíduo com anticorpos anti-*T. cruzi* das classes IgG e IgM, enquanto quatro indivíduos apresentaram somente anticorpos IgG.

Figura 5. Sorologia positiva (IgG) para *Trypanosoma cruzi* através da técnica de imunofluorescência indireta em indivíduo habitante de área endêmica de Pênfigo Foliáceo Endêmico (Fogo Selvagem). Titulação: 1: 640. (X200)

Figura 6. Distribuição dos anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* (anti-*T. cruzi*) e anti-desmogleína 1 recombinante (anti-rDsg1) em indivíduos sem Fogo Selvagem da região de Limão Verde, MS. Coeficiente de Pearson $r = -0,05$, $p > 0,05$.

Figura 7. A: *Immunoblotting* com antígenos excretados/secretados de tripomastigotas (TESA blot), polipeptídeos reconhecidos por IgG (colunas 1 a 5) de indivíduos sem Fogo Selvagem (FS) de Limão Verde (LV). B: Colunas 1' e 2', controles positivo e negativo, respectivamente. Pacientes nas colunas 1, 2, 3, 4 e 5 foram classificados como tendo forma indeterminada da doença de Chagas, reconhecendo uma banda entre 150- e 160- kDa (antígenos de fase crônica). Marcadores de peso molecular à esquerda: 205 kDa (miosina muscular cunicular); 116 kDa (galactosidase de *Escherichia coli*); 97 kDa (fosforilase muscular cunicular); 66kDa (albumina bovina).

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Pênfigo foliáceo endêmico (PFE) ou Fogo Selvagem (FS) representa um modelo singular de condição autoimune que pode ser desencadeada por fatores ambientais em indivíduos geneticamente predispostos. O alvo antigênico no FS é a porção extracelular da desmogleína 1(Dsg1), uma molécula de adesão que pertence à superfamília das caderinas, sendo reconhecida por anticorpos patogênicos da classe IgG, particularmente isótipos IgG4 (Aoki et al., 2011; Warren et al., 2000).

O reconhecimento de epítomos da Dsg1 não é restrito a doentes, como previamente descrito (Warren et al., 2000), podendo alcançar até 51% dos indivíduos sadios habitantes de áreas endêmicas. No presente trabalho, documentamos cerca de 22% de reatividade contra Dsg1 em indivíduos sem FS (Tabela 2), sugerindo que ainda há estímulo ambiental no desenvolvimento de auto-anticorpos, a despeito das mudanças ocorridas nas habitações de adobe e teto de sapé anteriormente descritas na aldeia Limão Verde (Aoki et al., 2004).

Alguns achados relacionados à resposta não-patogênica direcionada a Dsg1 são relevantes para reforçar a participação de fatores ambientais no FS, a seguir enumerados:

1. a prevalência de anti-Dsg1 da classe IgG é menor em indivíduos saudáveis que vivem distantes da região endêmica de FS (Sousa et al., 2009)
2. o predomínio da espécie de simúlideo, o *Simulium nigritum*, nas áreas de FS (Eaton et al., 1998), em contraste com a presença de espécies distintas de simúlideos em áreas não-endêmicas
3. a presença de resposta imune IgM ou IgE aumentada dirigida contra Dsg1 (Diaz et al., 2008; Qian et al., 2011) nas áreas endêmicas de FS
4. os levantamentos epidemiológicos enfatizando a importância das condições de habitação, bem como a exposição frequente a insetos hematófagos, como percevejos e barbeiros, por doentes de FS (Aoki et al., 2004).

A redução do percentual de indivíduos saudáveis com auto-anticorpos na população de Limão Verde, quando comparada ao estudo prévio (Warren et al., 2000), pode estar associada à menor exposição desses indivíduos a picaduras de insetos, bem como à melhoria nas condições das habitações na última década. Estes dados são reforçados pelo encontro de resposta anti-Dsg1 também reduzida nos doentes de FS (37,5% dos casos) (Tabela 1), indicando menor atividade da doença cutânea.

A análise da resposta anti-desmogleína 1 em enfermidades infecciosas vetor-mediadas foi um importante fator para a realização deste

trabalho. Em indivíduos com doenças parasitárias que são hematófago-mediadas como por exemplo, oncocercose, leishmaniose cutânea e doenças de Chagas, há auto-anticorpos anti-Dsg1 não-patogênicos circulantes no soro (Diaz et al., 2004). Ainda, reforçando o estímulo ambiental, demonstrou-se que na fase pré-clínica do FS há uma seleção de células B anti-Dsg1, antígeno-dirigida (Qian et al., 2009).

A superposição de áreas endêmicas de FS e de doença de Chagas nos levou a buscar possível correlação entre essas duas enfermidades, que apresentam também a participação de vetores hematófagos na sua gênese.

A doença de Chagas constitui um problema de saúde pública importante em muitos países da América Latina, com diferenças na sua epidemiologia relativa a populações ameríndias distribuídas ao longo do continente (Rothhammer et al., 1985). Em populações de nativos da América do Sul localizadas nas terras altas (ou seja, Bolívia, Argentina, Chile), registros de doença de Chagas são feitos desde a era pré-colombiana (Rothhammer et al., 1985). Por outro lado, não há descrição de casos da doença entre nativos das regiões de planície, tampouco de *Triatoma sp* colonizando as habitações tradicionais indígenas (Coimbra, 1988).

Entre a população nativa brasileira, não há evidência de *Trypanosoma sp* em índios das tribos Xingu, Asurini, Karitiana e Surui (Coimbra, 1988). Em índios da tribo Xavante no Mato Grosso, todos os 168 indivíduos pesquisados testados para doença de Chagas mostraram-se soronegativos (Coimbra Junior et al., 1992).

Tem-se sugerido que a endemicidade da doença de Chagas em populações ameríndias que habitam áreas altas está associada a características relacionadas à domiciliação precoce dos triatomíneos e manutenção de um ciclo doméstico do *T. cruzi* (Coimbra Junior et al., 1992; Lent e Wygodzinsky, 1979). Interessante notar que ameríndios em áreas planas costumavam conviver em pequenos aglomerados, com elevada mobilidade na região habitada e sem animais domesticados, semelhante às condições observadas entre as populações nativas estudadas no Brasil (Coimbra Junior et al., 1992). Entre os fatores que podem justificar esse padrão de ocupação, destacam-se os fatores comportamentais e as adaptações dos indígenas em relação ao meio habitado. Estes fatores interligam-se à domiciliação dos insetos vetores (triatomíneos).

A população Terena da reserva indígena Limão Verde (LV) apresenta características próximas àquelas tribos de ameríndios do altiplano, ou seja, com domesticação de animais, criação de aves nas habitações e baixa mobilidade. Estas condições, quando associadas a habitações com tetos de sapé e paredes de adobe fornecem um ambiente adequado ao processo de domiciliação de diversas espécies de triatomíneos. A importância da moradia neste processo pode ser corroborada pela positividade de 3 indivíduos habitando a mesma moradia (Figura 8).

Figura 8. Familiares habitantes de Limão Verde com sorologia positiva para doença de Chagas.

O entomologista do grupo Cooperativo de Pesquisa sobre o Fogo Selvagem, Donald Eaton, realizou pesquisa em LV e detectou quatro espécies predominantes: *Triatoma matogrossensis*, *Triatoma sordida*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus geniculatus* (comunicação pessoal). Taxas de infecção natural com *T. cruzi* ainda não foram registradas para essas espécies (Eaton DP *et al*, não publicados). Esses dados são compatíveis com estudos prévios sobre perfil de *Reduviidae* no ambiente doméstico no Estado do Mato Grosso do Sul (Almeida et al., 2008).

Apesar de haver registro da presença de triatomíneos dentro das moradias, e frequente exposição a barbeiros em estudo prévio realizado na

reserva Limão Verde, nenhum caso de doença de Chagas havia sido documentado (Aoki et al., 2004).

Atualmente, entre os indivíduos soropositivos para o *T. cruzi* do nosso estudo, não detectamos reatividade cruzada com desmogleína 1, sugerindo não haver relação entre *T. cruzi* e FS. Além disso, avaliando a figura 6, observamos que no estudo de regressão linear da distribuição dos anticorpos anti-Dsg1 e anti-*T. cruzi*, o coeficiente de Pearson (r) é igual a -0,05, e sem significância estatística, sugerindo que as distribuições entre esses anticorpos apresentam correlação nula.

Na literatura, há um único relato de oito soros de doentes com pênfigo foliáceo com reatividade de anticorpos IgG contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* através de técnica de imunofluorescência indireta. No entanto, não há informações epidemio-clínico-patológicas que corroborem o diagnóstico confirmado desses doentes de PF (Primavera et al., 1990).

Até o momento, não se tem conhecimento de como ocorre o desenvolvimento de auto-anticorpos anti-Dsg1 no soro de doentes de Chagas; é possível que componentes da saliva de insetos hematófagos possam induzir uma resposta imune contra Dsg1 (Diaz et al., 2004).

Interessante notar que indivíduos que vivem em áreas infestadas por triatomíneos produzem anticorpos da subclasse IgG4 direcionados contra antígenos protéicos provenientes das glândulas salivares de *Triatoma infestans* (Nascimento et al., 2001). Em estudo recente, sialotranscriptoma

de *T. matogrossensis* proveniente de áreas de alto risco para FS foi descrito por Assumpção e colaboradores. Este estudo poderá facilitar a identificação de antígenos com potencial para desencadear resposta imune contra Dsg1 e consequente fogo selvagem; ainda, permitirá o desenvolvimento de biomarcadores para identificação de baixos níveis de infestação de triatomíneos (Assumpção et al., 2012).

Os métodos convencionais para diagnóstico sorológico da doença de Chagas são classicamente ELISA e IFI. Em estudos prévios, a sensibilidade do método ELISA variou de 97,7% a 100%, e a especificidade, de 93,3% a 100%; em relação a IFI, a sensibilidade variou de 72% a 100% e a especificidade, de 96% a 100%. A acurácia de ambos os testes apresenta melhores resultados nas formas crônicas da doença de Chagas, incluindo a forma indeterminada, apesar de haver frequente reação cruzada, especialmente com leishmaniose (Malan et al., 2006; Oelemann et al., 1998). Há relatos de reação cruzada dos testes convencionais com doenças autoimunes (Velasquez et al., 1993).

A confirmação dos resultados positivos por IFI deve ser realizada por TESA blot, que é um método diagnóstico com 100% de especificidade, não ocorrendo reação cruzada para antígeno do *T. cruzi* de peso molecular entre 130 e 200 kDa (antígenos de fase aguda) ou antígenos entre 150 e 160 kDa (antígenos de fase crônica) (Umezawa et al., 1996).

Em nosso estudo, os casos submetidos ao TESA blot (Figura 7) demonstraram bandas que correspondem a antígenos de fase crônica entre

150 e 160 kDa, confirmando a forma indeterminada da doença de Chagas em todos os cinco indivíduos sem fogo selvagem testados por ELISA e IFI.

Nos cinco indivíduos com a forma indeterminada da doença de Chagas, detectamos anticorpos da classe IgG direcionados contra epimastigotas de *T. cruzi*. Os anticorpos IgG se correlacionam com a forma crônica da doença de Chagas. É relevante ressaltar o achado de anticorpo IgM contra epimastigotas de *T. cruzi* em um dos indivíduos testados. Este achado poderia sugerir a possibilidade de infecção aguda, visto que em estudo prévio detectou-se que testes IFI realizados com epimastigotas possuem elevada sensibilidade para diagnóstico de doença de Chagas aguda (Primavera et al., 1990) quando são positivos para IgM.

No presente estudo, o teste TESA blot realizado nos cinco soros positivos não evidenciou bandas correspondentes a antígenos de fase aguda (peso molecular entre 130 e 200 kDa), descartando a possibilidade de doença de Chagas aguda nos indivíduos testados.

A fisiopatologia da doença de Chagas tem sido relacionada ao processo autoimune. A resposta imune na infecção crônica por *T. cruzi* tem características de hipersensibilidade do tipo tardia com predomínio de células T CD8+ sobre CD4+. Apesar de a imunidade mediada por células desempenhar um papel central neste processo, a imunidade humoral pode ter participação através de imunoglobulinas da classe IgG, direcionadas contra antígenos próprios como neurônios, homogeneizados de nervo ciático e ribonucleoproteínas nucleares. Além desses, o sistema complemento através do complexo de ataque de membrana (MAC) foi

identificado em miócitos cardíacos de doentes de Chagas (Cunha-Neto et al., 2006).

À semelhança do Fogo Selvagem, a hipótese do mimetismo molecular aparece como importante fenômeno na autoimunidade da doença de Chagas. Antígenos do *T. cruzi*, como por exemplo a proteína B13, fração microssômica, glicolipídios sulfatados e proteína ribossômica foram descritos como moléculas que podem induzir reatividade cruzada contra antígenos próprios encontrados no músculo cardíaco humano (miosina cardíaca, proteína ribossômica humana) ou no tecido nervoso.

Além disso, auto-anticorpos anti-neurônios encontrados em doentes de Chagas podem estar ligados a disfunção autonômica do sistema nervoso encontrada nestes doentes. Adicionalmente, foram identificados clones de células T sensibilizadas com proteína B13 em portadores de doença de Chagas crônicos com cardiomiopatia, demonstrando múltiplos epítomos com reatividade cruzada entre a proteína B13 do *T. cruzi* e a cadeia pesada da miosina cardíaca humana (Cunha-Neto et al., 2006).

A importância da autoimunidade na doença de Chagas tem suscitado questões principalmente na forma indeterminada, pois grande número de doentes permanecem sem desenvolvimento de manifestações clínicas ao longo da vida. Os casos relatados nesse estudo podem contribuir para o estudo da autoimunidade na doença de Chagas, uma vez que essa população indígena é geneticamente predisposta a eventos autoimunes como por exemplo ao Fogo Selvagem.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1. Nosso estudo revelou pela primeira vez a ocorrência de doença de Chagas, forma indeterminada, em uma população ameríndia Terena da aldeia de Limão Verde, uma área endêmica de fogo selvagem.

2. Nenhum doente de fogo selvagem da reserva indígena Terena de Limão Verde, Aquidauana (MS) apresentou reatividade contra o *Trypanosoma cruzi*.

3. A resposta anti-desmogleína 1 nos doentes de fogo selvagem foi encontrada em 37,5% (15/40) dos doentes. Auto-anticorpos anti-desmogleína 1 nos indivíduos sem fogo selvagem foram encontrados em 22% (33/150) dos soros analisados.

4. Não houve concomitância de doença de Chagas e fogo selvagem na amostra populacional estudada de Limão Verde.

Apesar de não termos demonstrado coexistência de ambas as condições, a vigilância clínica, epidemiológica e imunológica para o fogo selvagem e para a doença de Chagas nesta área endêmica é mandatória, uma vez que essas doenças compartilham o mesmo habitat.

8. ANEXOS

ANEXO A. Sorologia para doença de Chagas (ELISA) e para Desmogleína 1 (rDsg1) em doentes de Pênfigo Foliáceo Endêmico (Fogo Selvagem)

N (Número do indivíduo)	ELISA (Chagas) Index A/C	ELISA (anti-rDsg1)
1	0,2	0
2	0,3	0
3	0,3	43
4	0,2	346
5	0,2	38
6	0,3	121
7	0,2	200
8	0,2	0
9	0,4	0
10	0,4	0
11	0,2	223
12	0,3	0
13	0,3	23
14	0,3	0
15	0,1	0
16	0,3	0
17	0,4	0
18	0,2	2
19	0,6	0
20	0,3	0

continua

conclusão

ANEXO A. Sorologia para doença de Chagas (ELISA) e para Desmogleína 1 (rDsg1) em doentes de Pênfigo Foliáceo Endêmico (Fogo Selvagem)

N (Número do indivíduo)	ELISA (Chagas) Index A/C	ELISA (anti-rDsg1)
21	0,3	0
22	0,3	422
23	0,1	0
24	0,3	26
25	0,3	0
26	0,2	0
27	0,2	0
28	0,2	0
29	0,3	0
30	0,4	28
31	0,3	2
32	0,9	0
33	0,3	0
34	0,2	0
35	0,4	67
36	0,3	0
37	0,4	33
38	0,3	220
39	0,4	178
40	0,4	27

Legenda:

Cut off ELISA doença de Chagas: 0,303

$A/C \geq 1.0$: reação positiva

$A/C < 0.8$: reação negativa

$0.8 \leq A/C < 1.0$: reação indefinida

Anti-rDsg1 : anticorpos anti-desmogleína 1 recombinante

Cut off ELISA anti-rDsg1: 20

ANEXO B. Sorologia para doença de Chagas (ELISA) e resposta anti-desmogleína 1 em indivíduos saudáveis habitantes de áreas endêmicas de Pênfigo Foliáceo Endêmico (Fogo Selvagem)

N (Número do indivíduo)	ELISA (Chagas) Index A/C	ELISA (anti-rDsg1)
1	0,3	0
2	0,3	9
3	0,3	0
4	0,3	0
5	0,3	0
6	0,3	0
7	0,2	0
8	0,3	0
9	0,4	37
10	0,3	73
11	0,3	0
12	0,5	0
13	0,3	0
14	0,5	122
15	0,4	0
16	0,2	14
17	0,3	37
18	0,4	0
19	0,4	0
20	0,5	0
21	0,3	0
22	0,4	0
23	0,4	145
24	0,4	0
25	0,3	0
26	0,3	49
27	0,4	0

continua

continuação

ANEXO B. Sorologia para doença de Chagas (ELISA) e resposta anti-desmogleína 1 em indivíduos saudáveis habitantes de áreas endêmicas de Pênfigo Foliáceo Endêmico (Fogo Selvagem)

N (Número do indivíduo)	ELISA (Chagas) Index A/C	ELISA (anti-rDsg1)
28	0,3	16
29	0,2	72
30	0,4	0
31	0,7	142
32	0,3	138
33	0,3	6
34	0,3	0
35	0,2	0
36	0,3	0
37	0,4	0
38	0,5	116
39	0,3	8
40	0,3	147
41	0,3	107
42	0,2	127
43	0,3	0
44	0,3	0
45	0,3	65
46	0,3	0
47	0,5	71
48	0,3	147
49	3,4	0
50	0,2	0
51	0,3	3
52	0,5	227
53	0,2	163

continua

continuação

ANEXO B. Sorologia para doença de Chagas (ELISA) e resposta anti-desmogleína 1 em indivíduos saudáveis habitantes de áreas endêmicas de Pênfigo Foliáceo Endêmico (Fogo Selvagem)

N (Número do indivíduo)	ELISA (Chagas) Index A/C	ELISA (anti-rDsg1)
54	0,4	0
55	0,2	1
56	0,2	0
57	0,2	1
58	0,3	19
59	0,2	13
60	0,2	2
61	0,2	0
62	0,2	0
63	0,2	2
64	0,4	3
65	0,5	0
66	0,4	11
67	0,2	9
68	0,2	0
69	0,2	0
70	0,1	3
71	0,2	2
72	0,2	0
73	0,1	0
74	4,4	0
75	0,2	1
76	0,2	0
77	0,2	1
78	0,2	2
79	0,2	20

continua

continuação

ANEXO B. Sorologia para doença de Chagas (ELISA) e resposta anti-desmogleína 1 em indivíduos saudáveis habitantes de áreas endêmicas de Pênfigo Folíaceo Endêmico (Fogo Selvagem)

N (Número do indivíduo)	ELISA (Chagas) Index A/C	ELISA (anti-rDsg1)
80	0,2	3
81	0,3	0
82	0,2	2
83	0,2	3
84	0,2	3
85	0,2	75
86	0,2	25
87	0,2	4
88	0,2	21
89	0,4	0
90	0,1	14
91	0,2	2
92	0,2	2
93	6,0	0
94	0,2	111
95	0,2	9
96	0,2	63
97	0,2	11
98	0,3	4
99	0,2	0
100	5,6	0
101	0,3	0
102	0,1	1
103	0,2	1
104	0,2	21
105	0,7	15

continua

continuação

ANEXO B. Sorologia para doença de Chagas (ELISA) e resposta anti-desmogleína 1 em indivíduos saudáveis habitantes de áreas endêmicas de Pênfigo Foliáceo Endêmico (Fogo Selvagem)

N (Número do indivíduo)	ELISA (Chagas) Index A/C	ELISA (anti-rDsg1)
106	0,7	82
107	0,2	4
108	0,5	2
109	0,2	9
110	0,2	0
111	0,2	22
112	0,2	4
113	0,5	3
114	0,2	1
115	0,3	4
116	0,2	20
117	0,5	1
118	0,2	1
119	0,2	3
120	0,2	2
121	0,4	19
122	0,3	6
123	0,2	7
124	0,7	30
125	9,9	10
126	0,3	2
127	0,3	5
128	0,3	13
129	0,2	2
130	0,6	1
131	0,2	3

continua

conclusão

ANEXO B. Sorologia para doença de Chagas (ELISA) e resposta anti-desmogleína 1 em indivíduos saudáveis habitantes de áreas endêmicas de Pênfigo Foliáceo Endêmico (Fogo Selvagem)

N (Número do indivíduo)	ELISA (Chagas) Index A/C	ELISA (anti-rDsg1)
132	0,2	7
133	0,1	5
134	0,3	6
135	0,4	102
136	0,3	27
137	0,3	7
138	0,2	135
139	0,2	0
140	0,2	17
141	0,3	8
142	0,2	6
143	0,2	0
144	0,2	2
145	0,2	9
146	0,2	6
147	0,2	4
148	0,2	5
149	0,2	2
150	0,2	101

Legenda:

Cut off ELISA doença de Chagas: 0,303

A/C $\geq$ 1.0: reação positiva

A/C < 0.8: reação negativa

$0.8 \leq$ A/C < 1.0: reação indefinida

Anti-rDsg1 : anticorpos anti-desmogleína 1 recombinante

Cut off ELISA anti-rDsg1: 20

9. REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS¹

Almeida PS, Ceretti Junior W, Obara MT, Santos HR, Barata JM, Faccenda O. [Survey of *Triatominae* (Hemiptera: *Reduviidae*) fauna in domestic environments and natural infection by *Trypanosomatidae* in the State of Mato Grosso do Sul]. Rev Soc Bras Med Trop, 2008; 41: 374-80.

Amagai M. Adhesion molecules. I: Keratinocyte-keratinocyte interactions; cadherins and pemphigus. J Invest Dermatol, 1995; 104: 146-52.

Amagai M, Matsuyoshi N, Wang ZH, Andl C, Stanley JR. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. Nat Med, 2000; 6: 1275-7.

Aoki V, Millikan RC, Rivitti EA, Hans-Filho G, Eaton DP, Warren SJ, Li N, Hilario-Vargas J, Hoffmann RG, Diaz LA. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). J Investig Dermatol Symp Proc, 2004; 9: 34-40.

Aoki V, Sousa JX, Jr., Diaz LA. Pathogenesis of Endemic Pemphigus Foliaceus. Dermatol Clin, 2011; 29: 413-8.

Aranha-Campos J. Penfigo foliaceo (Fogo Selvagem): Aspectos clinicos e epidemiologicos. Comp Melhoramentos: Sao Paulo - Brazil, 1942.

¹ De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.
Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Araujo A, Jansen AM, Reinhard K, Ferreira LF. Paleoparasitology of Chagas disease--a review. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009a; 104 Suppl 1: 9-16.

Araujo CA, Waniek PJ, Jansen AM. An overview of Chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis, 2009b; 9: 227-34.

Assumpção TCF, Eaton DP, Pham VM, Francischetti IMB, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Valenzuela JG, Diaz LA, Ribeiro JMC. An Insight into the Sialotranscriptome of *Triatoma matogrossensis*, a Kissing Bug Associated with Fogo Selvagem in South America. Am J Trop Med Hyg, 2012; accepted.

Auad A. Pênfigo foliáceo sul-americano no Estado de Goiás. . Revista de Patologia Tropical, 1972; 1: 293-346.

Bazzi H, Getz A, Mahoney MG, Ishida-Yamamoto A, Langbein L, Wahl JK, 3rd, Christiano AM. Desmoglein 4 is expressed in highly differentiated keratinocytes and trichocytes in human epidermis and hair follicle. Differentiation, 2006; 74: 129-40.

Berkowitz P, Chua M, Liu Z, Diaz LA, Rubenstein DS. Autoantibodies in the autoimmune disease pemphigus foliaceus induce blistering via p38 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling in the skin. Am J Pathol, 2008; 173: 1628-36.

Beutner EH, Jordon RE. Demonstration of Skin Antibodies in Sera of Pemphigus Vulgaris Patients by Indirect Immunofluorescent Staining. Proc Soc Exp Biol Med, 1964; 117: 505-10.

Beutner EH, Prigenzi LS, Hale W, Leme Cde A, Bier OG. Immunofluorescent studies of autoantibodies to intercellular areas of epithelia in Brazilian pemphigus foliaceus. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1968; 127: 81-6.

Brandalise NA, Andreollo NA, Leonardi LS, Callejas Neto F. Carcinoma associado a megaesôfago chagásico / Carcinoma associated with Chaga's megaesophagus. *Rev Col Bras Cir*, 1985; 12: 196-9.

Calvanico NJ, Swartz SJ, Diaz LA. Affinity immunoblotting studies on the restriction of autoantibodies from endemic pemphigus foliaceus patients. *J Autoimmun*, 1993; 6: 145-57.

Cerna M, Fernandez-Vina M, Friedman H, Moraes JR, Moraes ME, Diaz L, Stastny P. Genetic markers for susceptibility to endemic Brazilian pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) in Xavante Indians. *Tissue Antigens*, 1993; 42: 138-40.

Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online]. 1909, vol.1, n.2, pp. 159-218. ISSN 0074-0276. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1909; 1: 159-218.

Chan LS, Vanderlugt CJ, Hashimoto T, Nishikawa T, Zone JJ, Black MM, Wojnarowska F, Stevens SR, Chen M, Fairley JA, Woodley DT, Miller SD, Gordon KB. Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases. *J Invest Dermatol*, 1998; 110: 103-9.

Coimbra CEA. Human Settlements, Demographic Pattern, and Epidemiology in Lowland Amazonia: The Case of Chagas's Disease. *Am Anthropol*, 1988; 90: 82-97.

Coimbra Junior CE, Borges MM, Flowers NM, Santos RV, Piazza RF. Sero-epidemiological survey for Chagas' disease among the Xavante Indians of central Brazil. *Ann Trop Med Parasitol*, 1992; 86: 567-8.

Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2005; 38 (supl III): 1-29.

Cowley CM, Simrak D, Marsden MD, King IA, Arnemann J, Buxton RS. A YAC contig joining the desmocollin and desmoglein loci on human chromosome 18 and ordering of the desmocollin genes. *Genomics*, 1997; 42: 208-16.

Culton DA, Qian Y, Li N, Rubenstein D, Aoki V, Filho GH, Rivitti EA, Diaz LA. Advances in pemphigus and its endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) phenotype: a paradigm of human autoimmunity. *J Autoimmun*, 2008; 31: 311-24.

Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity*, 2006; 39: 41-54.

Diaz LA, Arteaga LA, Hilario-Vargas J, Valenzuela JG, Li N, Warren S, Aoki V, Hans-Filho G, Eaton D, dos Santos V, Nutman TB, de Mayolo AA, Qaqish BF, Sampaio SA, Rivitti EA. Anti-desmoglein-1 antibodies in onchocerciasis, leishmaniasis and Chagas disease suggest a possible etiological link to Fogo selvagem. *J Invest Dermatol*, 2004; 123: 1045-51.

Diaz LA, Prisanh PS, Dasher DA, Li N, Evangelista F, Aoki V, Hans-Filho G, dos Santos V, Qaqish BF, Rivitti EA. The IgM anti-desmoglein 1 response distinguishes Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem) from other forms of pemphigus. *J Invest Dermatol*, 2008; 128: 667-75.

Diaz LA, Sampaio SA, Rivitti EA, Martins CR, Cunha PR, Lombardi C, Almeida FA, Castro RM, Macca ML, Lavrado C, et al. Endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. J Invest Dermatol, 1989; 92: 4-12.

Dusek RL, Godsel LM, Green KJ. Discriminating roles of desmosomal cadherins: beyond desmosomal adhesion. J Dermatol Sci, 2007; 45: 7-21.

Eaton DP, Diaz LA, Hans-Filho G, Santos VD, Aoki V, Friedman H, Rivitti EA, Sampaio SA, Gottlieb MS, Giudice GJ, Lopez A, Cupp EW. Comparison of black fly species (Diptera: *Simuliidae*) on an Amerindian reservation with a high prevalence of fogo selvagem to neighboring disease-free sites in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. J Med Entomol, 1998; 35: 120-31.

Emery DJ, Diaz LA, Fairley JA, Lopez A, Taylor AF, Giudice GJ. Pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein-1. J Invest Dermatol, 1995; 104: 323-8.

Eyre RW, Stanley JR. Human autoantibodies against a desmosomal protein complex with a calcium-sensitive epitope are characteristic of pemphigus foliaceus patients. J Exp Med, 1987; 165: 1719-24.

Fernandes A, Iniguez AM, Lima VS, Souza SM, Ferreira LF, Vicente AC, Jansen AM. Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: Trypanosoma cruzi I in the archaeological remains of a human in Peruacu Valley, Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2008; 103: 514-6.

Getsios S, Huen AC, Green KJ. Working out the strength and flexibility of desmosomes. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004; 5: 271-81.

Guarneri AA. Comportamento em Triatomíneos. In Diotatui L, Oliveira MA, Santos JP, editors. Triatomíneos. Fundação Oswaldo Cruz: Belo Horizonte, 2008: 45.

Gurtler RE, Chuit R, Cecere MC, Castanera MB, Cohen JE, Segura EL. Household prevalence of seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in three rural villages in northwest Argentina: environmental, demographic, and entomologic associations. *Am J Trop Med Hyg*, 1998; 59: 741-9.

Hammer J, Gallazzi F, Bono E, Karr RW, Guenot J, Valsasnini P, Nagy ZA, Sinigaglia F. Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. *J Exp Med*, 1995; 181: 1847-55.

Hans-Filho G. Pênfigo Foliáceo Endêmico (Fogo Selvagem) entre indígenas Terena da aldeia Limão Verde Aquidauana-Mato Grosso do Sul. *Dermatologia*. Universidade de São Paulo: São Paulo, 1998.

Hans-Filho G, dos Santos V, Katayama JH, Aoki V, Rivitti EA, Sampaio SA, Friedman H, Moraes JR, Moraes ME, Eaton DP, Lopez AL, Hoffman RG, Fairley JA, Giudice GJ, Diaz LA. An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. *J Invest Dermatol*, 1996; 107: 68-75.

Henry MACA, Lerco MM, Oliveira WK. Câncer do esôfago em paciente com megaesôfago chagásico; Esophageal cancer in patient with chagasic megaesophagus. *Arq. gastroenterol*, 2007; 44: 151-5.

Ishii K. Greater diversity of desmosomal cadherins. *J Invest Dermatol*, 2003; 120: ix-x.

Jolly PS, Berkowitz P, Bektas M, Lee HE, Chua M, Diaz LA, Rubenstein DS. p38MAPK signaling and desmoglein-3 internalization are linked events in pemphigus acantholysis. *J Biol Chem*, 2010; 285: 8936-41.

Lent H, Wygodzinsky PW. Revision of the *Triatominae* (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Amer Mus Nat History*, 1979; 163: 125-520.

Li N, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Diaz LA. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Exp Med*, 2003; 197: 1501-10.

Lombardi C, Borges PC, Chaul A, Sampaio SA, Rivitti EA, Friedman H, Martins CR, Sanches Junior JA, Cunha PR, Hoffmann RG, et al. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (Fogo selvagem). "The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research". *J Invest Dermatol*, 1992; 98: 847-50.

Malan AK, Avelar E, Litwin SE, Hill HR, Litwin CM. Serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi*: evaluation of three enzyme immunoassays and an indirect immunofluorescent assay. *J Med Microbiol*, 2006; 55: 171-8.

Marin Neto JA, Simoes MV, Sarabanda AV. Chagas' heart disease. *Arq Bras Cardiol*, 1999; 72: 247-80.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, 2007; 115: 1109-23.

Marin-Neto JA, Rassi A, Jr. Pathology and pathogenesis of Chagas disease. In Basow DS, editor. *UpToDate*. UpToDate in Waltham, MA, 2012.

Martel P, Gilbert D, Drouot L, Prost C, Raux G, Delaporte E, Joly P, Tron F. A polymorphic variant of the gene coding desmoglein 1, the target autoantigen of pemphigus foliaceus, is associated with the disease. *Genes Immun*, 2001; 2: 41-3.

Minelli L. Geografia Médica do Pênfigo Foliáceo Sul-Americano no Estado do Paraná. *An Bras Dermatol*, 1976; 51: 73-5.

Moraes ME, Fernandez-Vina M, Lazaro A, Diaz LA, Filho GH, Friedman H, Rivitti E, Aoki V, Stastny P, Moraes JR. An epitope in the third hypervariable region of the DRB1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. *Tissue Antigens*, 1997; 49: 35-40.

Nascimento RJ, Santana JM, Lozzi SP, Araujo CN, Teixeira AR. Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against *Triatoma infestans* (*Hemiptera: Reduviidae*) salivary gland proteins. *Am J Trop Med Hyg*, 2001; 65: 219-26.

Oelemann WM, Teixeira MD, Verissimo Da Costa GC, Borges-Pereira J, De Castro JA, Coura JR, Peralta JM. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol*, 1998; 36: 2423-7.

Pavoni DP, Roxo VM, Marquart Filho A, Petzl-Erler ML. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. *Genes Immun*, 2003; 4: 110-6.

Pereira NF, Hansen JA, Lin MT, Roxo VM, Braun K, Petzl-Erler ML. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. *Cytokine*, 2004; 28: 233-41.

Petzl-Erler ML, Malheiros D. Pemphigus foliaceus and desmoglein 1 gene polymorphism: is there any relationship? J Autoimmun, 2005; 25: 121-5.

Primavera KS, Umezawa ES, Peres BA, Camargo ME, Hoshino-Shimizu S. Chagas'disease: IgA, IgM and IgG antibodies to *T. cruzi* amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1990; 32: 172-80.

Puttagunta S, Mathur M, Cowin P. Structure of DSG1, the bovine desmosomal cadherin gene encoding the pemphigus foliaceus antigen. Evidence of polymorphism. J Biol Chem, 1994; 269: 1949-55.

Qian Y, Clarke SH, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Diaz LA. Antigen selection of anti-DSG1 autoantibodies during and before the onset of endemic pemphigus foliaceus. J Invest Dermatol, 2009; 129: 2823-34.

Qian Y, Prisayan P, Andraca E, Qaqish BF, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Diaz LA. IgE, IgM, and IgG4 anti-desmoglein 1 autoantibody profile in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). J Invest Dermatol, 2011; 131: 985-7.

Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet, 2010; 375: 1388-402.

Robinson ND, Hashimoto T, Amagai M, Chan LS. The new pemphigus variants. J Am Acad Dermatol, 1999; 40: 649-71; quiz 72-3.

Rocha-Alvarez R, Friedman H, Campbell IT, Souza-Aguiar L, Martins-Castro R, Diaz LA. Pregnant women with endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) give birth to disease-free babies. J Invest Dermatol, 1992; 99: 78-82.

Rock B, Labib RS, Diaz LA. Monovalent Fab' immunoglobulin fragments from endemic pemphigus foliaceus autoantibodies reproduce the human disease in neonatal Balb/c mice. *J Clin Invest*, 1990; 85: 296-9.

Rock B, Martins CR, Theofilopoulos AN, Balderas RS, Anhalt GJ, Labib RS, Futamura S, Rivitti EA, Diaz LA. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *N Engl J Med*, 1989; 320: 1463-9.

Roscoe JT, Diaz L, Sampaio SA, Castro RM, Labib RS, Takahashi Y, Patel H, Anhalt GJ. Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. *J Invest Dermatol*, 1985; 85: 538-41.

Rothhammer F, Allison MJ, Nunez L, Standen V, Arriaza B. Chagas' disease in pre-Columbian South America. *Am J Phys Anthropol*, 1985; 68: 495-8.

Sharma P, Mao X, Payne AS. Beyond steric hindrance: the role of adhesion signaling pathways in the pathogenesis of pemphigus. *J Dermatol Sci*, 2007; 48: 1-14.

Sousa JX, Jr., Freitas E, Delgado L, Coelho T, Aoki V. Antidesmoglein 1 reactivity in a healthy Brazilian population at low risk for endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Am Acad Dermatol*, 2009; 60: AB10.

Stanley JR, Amagai M. Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. *N Engl J Med*, 2006; 355: 1800-10.

Stanley JR, Koulu L, Thivolet C. Distinction between epidermal antigens binding pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies. *J Clin Invest*, 1984; 74: 313-20.

Tarleton RL, Zhang L, Downs MO. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94: 3932-7.

Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in chagas disease--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2006; 101: 463-91.

Torres FW, Acquatella H, Condado JA, Dinsmore R, Palacios IF. Coronary vascular reactivity is abnormal in patients with Chagas' heart disease. *Am Heart J*, 1995; 129: 995-1001.

Tron F, Gilbert D, Mouquet H, Joly P, Drouot L, Makni S, Masmoudi H, Charron D, Zitouni M, Loiseau P, Ben Ayed M. Genetic factors in pemphigus. *J Autoimmun*, 2005; 24: 319-28.

Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N, Jr., Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, Camargo ME. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol*, 1996; 34: 2143-7.

Vanderlugt CJ, Miller SD. Epitope spreading. *Curr Opin Immunol*, 1996; 8: 831-6.

Velasquez E, Reyes L, Thors C, Miettinen A, Chinchilla M, Linder E. Autoantibodies give false positive reactions in the serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1993; 87: 35.

Warren SJ, Arteaga LA, Rivitti EA, Aoki V, Hans-Filho G, Qaqish BF, Lin MS, Giudice GJ, Diaz LA. The role of subclass switching in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol*, 2003; 120: 104-8.

Warren SJ, Lin MS, Giudice GJ, Hoffmann RG, Hans-Filho G, Aoki V, Rivitti EA, Santos V, Diaz LA. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. N Engl J Med, 2000; 343: 23-30.

Waschke J. The desmosome and pemphigus. Histochem Cell Biol, 2008; 130: 21-54.

Waschke J, Bruggeman P, Baumgartner W, Zillikens D, Drenckhahn D. Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. J Clin Invest, 2005; 115: 3157-65.

Whitlock NV, Bower C. Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4. J Invest Dermatol, 2003; 120: 523-30.