

# ANNAIS

ACADEMIA DE MEDICINA  
DA BAHIA



VOLUME 13  
JUNHO 2004

---

SALVADOR-BAHIA

# IMPORTÂNCIA DAS REINFECÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DA MIOCARDITE CRÔNICA CHAGÁSICA

*Sonia G. Andrade*

**Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fiocruz  
Salvador, Bahia**

## INTRODUÇÃO

Em recente publicação, Pinto Dias e cols (2002) fizeram uma extensa revisão sobre “o impacto do controle da doença de Chagas na America Latina”, na qual avaliam o papel da prevenção da transmissão da doença, pela eliminação dos vetores domésticos, além do controle da transmissão por transfusão sanguínea. Concluem estes autores que, em termos clínicos, os casos de doença de Chagas crônicos apresentam significativa redução da sua morbidade e da mortalidade precoce, devida à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, após o extenso controle vetorial no Brasil e em outros países do Cone Sul. Esta constatação leva à conclusão de que, indivíduos nas áreas endêmicas da doença de Chagas são sujeitos a múltiplas reinfecções. o que se constituiria em um importante fator determinante do aumento da carga parasitária e da morbidade da doença e que a rotura desta cadeia, pelo controle do vetor, influenciou positivamente no sentido de diminuir o risco de desenvolvimento de uma cardiopatia grave nos indivíduos infectados.

Desde os seus primeiros estudos sobre a infecção pelo *T. cruzi* Carlos Chagas (1910), assinalou que “Nas formas

crônicas da doença dos indivíduos que haviam se infectado desde a infância, a persistência do parasito poderia ser devida à reinfecção". Também Evandro Chagas (1932) chamou a atenção para a possibilidade de múltiplas reinfecções nas áreas endêmicas e postulou que "A patogenicidade do *Schyzotrypanum cruzi* estaria na dependência de infecções sucessivas".

Embora tenha havido, a partir da década de 80 um efetivo controle dos triatomíneos da espécie *Triatoma infestans*, a transmissão da doença ainda não está totalmente erradicada e há sempre o perigo de que espécies antes silvestres venham a se domiciliar (Borges et al., 1999). Deste modo, nas áreas endêmicas da doença de Chagas, a transmissão vetorial do *Trypanosoma cruzi* pode ocorrer, não só pelos triatomíneos de hábitos domiciliares como através daqueles que vêm a se domiciliar, devido às alterações que ocorrem no seus ecótopos silvestres (Diotaiuti et al., 1995 ; Barrett et al., 1979). Embora um mesmo tipo de cepa predomine em uma mesma área endêmica, em um círculo fechado de transmissão ( Luquetti et al., 1986), a introdução de novas espécies de barbeiro pode veicular cepas diferentes do *T. cruzi* que, deste modo, passam a infectar pessoas antes já infectadas com cepas locais. Além disto, naquelas populações que conviveram com o barbeiro durante sua infância até atingirem a vida adulta, antes mesmo de se terem erradicado os vetores, há a possibilidade de que múltiplas infecções venham a se instalar.

A primeira observação com bases concretas, indicando o papel da erradicação do vetor na diminuição da morbidade da doença de Chagas, foi publicada por Emanuel Dias (1963) que realizou um estudo sobre os efeitos da super-infecção sobre a evolução da cardiopatia crônica chagásica, tendo verificado que após o expurgo dos vetores em Bambuí, MG, desapareceram os grupos com insuficiência cardíaca e os demais casos ficaram estacionários nas suas formas clínicas.

Em interessante trabalho clinico-epidemiológico desenvolvido na área de São Felipe, BA, a possibilidade de que múltiplas infecções possam vir a agravar os quadros clínico-patológicos da doença foi investigada por Macedo (1973) pelo estudo de chagásicos que viviam em áreas em que houve o expurgo dos vetores em comparação com os que permaneciam em áreas com manutenção da transmissão, observando diferenças significantes de morbidade nas duas áreas.

Do ponto de vista experimental, Brumpt et al (1913) foram os primeiros a demonstrar que animais infectados com *T. cruzi* e que sobreviviam à infecção passavam a apresentar forte imunidade à reinfeção. Desde então, vários outros autores vêm estudando o papel das reinoculações de *T.cruzi* ( Andrade et al., 1970; Revelli et al., 1990) no desenvolvimento da doença. Baseados nestes estudos têm sido também realizadas tentativas de imunização de animais com formas atenuadas de cultura ( Menezes, 1969 a,b, McHardy,1977). Revelli et al.1990) demonstraram que a reinfeção não reproduz o quadro agudo, não modifica o tipo e o grau da lesão cardíaca , entretanto há um maior comprometimento do eletrocardiograma.

Em trabalho experimental em camundongos, Andrade et al (1970 ) estudaram a resposta às infecções repetidas, demonstrando que a primeira infecção confere resistência a uma segunda inoculação, não se desenvolvendo uma nova fase aguda no animal reinoculado. Entretanto foi também demonstrado neste mesmo estudo, que os parasitos de ambas as cepas podem ser recuperados, isto é, a resistência à reinoculação é apenas relativa e o parasito reinoculado pode sobreviver. Isto tem implicações não apenas em relação ao problema relacionado com possibilidade de vacinas contra o *T.cruzi* (Seah et al.1969, Ritter et al. 1984,

Basombrio et al.1993, Revelli et al.1993, Paiva et al. 1999), como na quimioterapia (Meckert et al. 1988, Andrade et al.1992, De Andrade et al.1996).

Há, portanto, a possibilidade de coexistência de mais de uma cepa em um mesmo hospedeiro e de que haja múltiplas infecções, quer seja com a mesma cepa ou com diferentes cepas. Qual a repercussão disto sobre as lesões tissulares?

Haveria nestes casos, agravamento das lesões?

Diante destas perguntas, é de interesse se investigar a influência de múltiplas inoculações com diferentes cepas do *T. cruzi* em camundongos e tentar demonstrar nos animais com múltiplas inoculações a coexistência de diferentes cepas pela caracterização biológica e isoenzimática em isolados obtidos em diferentes períodos pós-inoculação. Isto poderá trazer um subsídio para a interpretação dos casos de Doença de Chagas em pacientes que permanecem nas áreas endêmicas sujeitos a novas infecções.

Resolvemos investigar a influência de múltiplas inoculações na evolução da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos experimentalmente infectados, avaliados de acordo com diferentes parâmetros biológicos, bioquímicos e histopatológicos. A intensidade das lesões determinadas no animal experimental com múltiplas infecções foi avaliada. Foi também investigada a possibilidade de persistência de mais de uma cepa no animal experimental através da hemocultura e caracterização isoenzimática dos parasitos isolados. Foram utilizadas três cepas representativas de cada biotipo de *T. cruzi* de acordo com a classificação de Andrade (1974). A cepa Y ( TIPO I), que produz picos parasitemicos precoces (9- 10 dias) e 100% de mortalidade entre 10 e 12 dias de infecção; formas delgadas predominam e existe um

macrófagotropismo proeminente em camundongos Suíços. A cepa 21 SF (TIPO II) apresenta picos parasitêmicos irregulares (entre 12 e 20 dias) e determina um grau de mortalidade moderado (entre 20 e 25 dias pós-infecção); durante a infecção as formas largas predominam e existe notável lesão do miocárdio. A cepa Colombiana (TIPO III) induz baixa mortalidade durante a fase aguda e tem picos parasitêmicos tardios (20-30 dias); características importantes são a predominância de formas largas e tropismo pelo músculo esquelético. Estas características bem definidas permitem caracterizar e re-isolar as cepas nos animais com múltiplas infecções.

A primeira inoculação com a cepa Colombiana, que tem evolução lenta e progressiva permitiu a sobrevivência de um número suficiente de camundongos para que se fizessem as novas inoculações. Após 50 dias de infecção com a cepa Colombiana, foi feita a inoculação com a cepa São Felipe e, após 20 dias, foi inoculada nos animais com dupla infecção um terceiro inóculo com a cepa Y. Em todas as vezes os inóculos foram de 50.000 tripomastigotas sanguíneas. Não se desenvolveu uma nova fase aguda nos animais reinoculados, o que foi monitorado pelo acompanhamento diário da parasitemia.

Para identificação das cepas presentes no animal com múltiplas infecções, foi realizada a caracterização isoenzimática em extratos parasitários obtidos de hemoculturas do sangue dos camundongos dos diferentes grupos experimentais.

As seguintes enzimas foram analisadas: Fosfoglicomutase (PGM) Glicosefosfato isomerase (GPI) Aspartato aminotransferase (ASAT) Alanina aminotransferase (ALAT) por eletroforese em gel de amido.

Os animais com infecção crônica pela cepa Colombiana e que foram reinoculados com a cepa 21SF do *T. cruzi*, não mostraram alterações, persistindo a parasitemia em níveis muito baixos; bem como os animais do grupo crônico com dupla infecção pela cepa Colombiana e a cepa 21SF e que foram reinoculados com a cepa Y. Os grupos controles de infecção única com as cepas 21 SF e Y mostraram curvas parasitêmicas com ascensão rápida, características dos biotemas TIPO II e I respectivamente.mn.

Houve baixa mortalidade naqueles grupos que foram reinoculados na fase crônica, variando de 0 a 10%.

O estudo histopatológico comparativo dos diversos grupos experimentais, considerando o grau de lesões inflamatórias e a intensidade de parasitismo em miocárdio e músculo esquelético mostrou nos animais com infecção crônica pela cepa Colombiana, correspondente ao período de 70 a 115 dias, lesões inflamatórias discretas a moderadas em miocárdio e músculo esquelético. Não foram detectados parasitos, a não ser em um caso em músculo esquelético. Na infecção tríplice, correspondendo à infecção pela cepa Colombiana de 100 a 115 dias, (cepa 21SF de 50 a 65 dias e cepa Y de 30 a 45 dias), observou-se um nítido aumento da intensidade das lesões inflamatórias em miocárdio e em músculo esquelético quando comparadas com a infecção crônica pela cepa Colombiana, nos mesmos períodos e com a reinfecção pela cepa 21 SF (dupla infecção). Na infecção tríplice, as lesões variaram de moderadas a intensas embora os parasitos fossem escassos no miocárdio. Em músculo esquelético os parasitos ocorriam em maior frequência e correspondiam a lesões necróticas do músculo com acentuado infiltrado inflamatório focal e difuso, reproduzindo o padrão da cepa Colombiana.

Ao exame isoenzimático das enzimas ALAT, ASAT, PGM e GPI foi observado que os animais infectados com as

três cepas apresentavam um padrão eletroforético característico da cepa Y (tipo I), indicando a persistência desta cepa, apesar de não ter determinado a fase aguda característica.

Os achados experimentais mostraram que camundongos previamente infectados apresentam resistência a reinoculação, o que foi demonstrado pelo estudo das curvas parasitêmicas que se mantiveram inalteradas, em níveis baixos, após reinoculação com diferentes cepas e pela percentagem de mortalidade que foi abaixo de 10% na reinoculação com cepa 21SF e 0% na reinfecção com a cepa Y, enquanto que a infecção aguda, em animais não previamente inoculados, determinou uma percentagem de 40% de mortalidade com cepa 21 SF no 20º dia de infecção e uma percentagem de 100% com a cepa Y, no 11º dia de infecção.

Aparentemente a resistência desenvolvida a uma reinoculação não impediu a multiplicação das cepas de reinfecção, principalmente se considerarmos a cepa Y do Biodema tipo I que é caracteristicamente muito virulenta, a qual foi revelada nos animais com tríplice infecção pela análise isoenzimática. A revelação da presença da cepa Y pelo estudo isoenzimático na tríplice infecção sugere que a cepa Y, de alta virulência, é capaz de vencer a resistência dos animais à reinoculação, embora não determinando uma nova fase aguda nem determinando o aumento do parasitismo tissular. Além disto, a exacerbação das lesões inflamatórias em miocardio e músculo esquelético sugere uma reativação nos animais com tríplice infecção, da resposta imunológica celular.

A comprovação da presença dos parasitos da cepa Y, usada nos animais na terceira infecção, fala contra a possibilidade de imunização com uso de vacinas de formas parasitárias, e reforça a constatação de que, embora uma



infecção prévia possa determinar uma resistência ao desenvolvimento de uma nova fase aguda, não impede que se instalem novas infecções que venham agravar a doença de Chagas.

Disto decorre a grande importância de um efetivo e contínuo controle da transmissão da infecção não apenas pelo combate ao vetor como pela vigilância em bancos de sangue, além de outros meios.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano Rev. Patol. Trop. 3:65-121, 1974.
- ANDRADE, S.G.; CARVALHO, M.L.; FIGUEIRA, R.M.; ANDRADE Z.A. Recuperação e caracterização de tripomastigotas inoculados em animais imunes (Reinoculação com diferentes cepas do *T. cruzi*); Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo, 12: 395-402, 1970;
- ANDRADE, S.G.; RASSI, A.; MAGALHÃES, J.B.; FILHO, F.F.; LUQUETTI, A.O.; Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 86, 624-626, 1992;
- BARRETT T.V.; HOFF, R.; MOTT, K.E.; GUEDES, F.; SHERLOCK, I.A. An outbreak of acute Chagas' disease in the São Francisco Valley region of Bahia, Brazil: triatomine vectors and animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi*, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 73 (6):703-709, 1979.
- BASOMBRI, M.A.; SEGURA, M.A.; MOURA, M.C.; GOMEZ, L. Field trial of vaccination against American Trypanosomiasis (Chagas' disease) in dogs. **Am. J. Trop. Med Hyg**, 49(1):143-51, 1993.
- BORGES, E.; PIRES, H.; BARBOSA, S.; NUNES, C.; PEREIRA, M.; ROMANHA, A.; DIOTAIUTI, L. Genetic variability in Brazilian triatomines and risk of domiciliation; **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 (suppl 1): 371-373, 1999.

- BRENER, Z. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da Doença de chagas experimental. 'Livre Docência" TESE. Universidade Federal de Minas Gerais, pp79.
- BRUMPT E. Immunité partielle dans les infections à *Trypanosoma cruzi*, transmission de ce trypanosome par *Cimex rotundus*. Rôle régulateur des hotes intermédiaires. Passage à travers la peau. Bull. Soc. Exot. 6: 172-6, 1913.
- CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem. **Brasil Médico** 24: 423-428, 1910.
- CHAGAS, E. Novos estudos sobre a forma cardíaca da trypanosomiase americana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 26: 329-338, 1932.
- De ANDRADE, A.L.; ZICKER, F.; DE OLIVEIRA, R.M.; ALMEIDA SILVA, S.; LUQUETTI, A.; TRAVASSOS, L.R.; ALMEIDA, I.C.; DE ANDRADE, S.S.; DE ANDRADE, J.G.; MARTELLI, C.M. Randomised trial of efficacy of benzonidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infected, **Lancet** 348:1407-13, 1996.
- DIAS, E. Os efeitos da super-infecção sobre a evolução da cardiopatia crônica chagásica. **Rev. Goiana Méd.** 9: 233-239, 1963.
- DIOTAIUTI, L.; PEREIRA, A.S.; LOIOLA, C.F.; FERNANDES, A.J.; SCHOFIELD, J.C.; DUJARDIN, J.P.; DIAS, J.C.; CHIARI, E. Interrelation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais; **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 90(4): 443-8, 1995.
- LUQUETTI, A.O.; MILES, M.A.; RASSI, A.; DE REZENDE, J.M.; DE SOUZA, A.A.; PÓVOA, M.M.; RODRIGUES, I. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil, **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 80:462-470(1986).
- MACEDO, V.O.; Influência da exposição à reinfecção na evolução da Doença de Chagas( Estudo longitudinal de cinco anos). **Rev. Patol. Trop.**5: 33-116, 1976.
- MCHARDY, H. Immunization of mice against *Trypanosoma cruzi*. The effect of size of dose and route of injection of immunizing and challenge inocula, **Tropenmed. Parasitol.** 28(1) 11-6; 1977.
- MECKERT, C.; CHAMBO, J.G.; LAGUENS, R.P. Differences in resistance to reinfection with low and high inocula of *Trypanosoma cruzi* in

- chagasic mice treated with nifurtimox and relation to immune response. **Antimicrob Agents Chemother**, **32**(2):241-5, 1988.
- MENEZES, H. Active immunization of mice with the avirulent Y strain of *Trypanosoma cruzi* against heterologous virulent strain of the same parasite, **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** **11**(5):335-42, 1969a.
- MENEZES H, Active immunization of dogs with a non virulent strain of *Trypanosoma cruzi*, **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** **11**(4):258-63, 1969b.
- MILES, M.A. Further enzyme characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **74**:221-237, 1980.
- PAIVA, C.N.; CASTELO- BRANCO, M.T.; ROCHA, J.Á.; LANNES-VIEIRA, J.; GATTASS, C.R. *Trypanosoma Cruzi*: lack of T cell abnormalities in mice vaccinated with live trypomastigotes **Parasitol Res**, **85**(12): 1012-7, 1999.
- PINTO DIAAS, J.C, SILVEIRA, A.C, SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas disease control in Latin-America – A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **97**: 603-612, 2002.
- REVELLI, S.; BASOMBRIO, M.A.; VALENTI, J.L.; MORENO, H.; POLI, H.; MORINI, J.C. Evolution of an attenuated *Trypanosoma cruzi* strain in rats. Analysis of survival, parasitemia and tissue damage; **Medicina.( B Aires)**, **53** (1):39-43, 1993.
- REVELLI, S.; BERRA, H.; VALENTI, J.; MORENO, H.; BERNASCONI, M.; POLI, H.; MORINI, J.; Effect of reinfection on the development of rats infected with *Trypanosoma cruzi*, **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** **32**(4): 260-8, 1990.
- RITTER, D.M.; ROWLAND, E.C. Corpus chriti strain- induced protection to *Trypanosoma* infection in C3H( HE) mice : effective dose, time, route and number of vaccinations. **J. Parasitol** **70**(5): 755-9, 1984.
- SEAH, S.; MARSDEN, P.D. The protection of mice against a virulent strain of *Trypanosoma cruzi* by previous inoculation with na avirulent strain. **Am. Trop. Med. Parasitol.** **63**(2): 211-4, 1969.