

# O papel das reinfecções na patologia da doença de Chagas vista através o modelo experimental

Sonia Gumes Andrade<sup>1</sup>

A “Sustentabilidade dos programas de controle vetorial da doença de Chagas”, tem sido preocupação constante de todos aqueles responsáveis por este importante problema, o qual envolve não apenas o controle do *Triatoma infestans* mas as possibilidades e as conseqüências de múltiplas infecções decorrentes de domiciliação de novas espécies de triatomíneos<sup>6</sup>. 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 venham a se domiciliar, devido às alterações que ocorrem nos seus ecótopos silvestres<sup>5 11</sup>.

Em 2002, Pinto Dias et al.<sup>12</sup> fizeram uma extensa revisão sobre “o impacto do controle da doença de Chagas na América Latina”, na qual avaliaram 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 crônicos de doença de Chagas apresentaram 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 vem dar apoio à hipótese de que os indivíduos nas áreas endêmicas da doença de Chagas estariam sujeitos a múltiplas reinfecções, o que se constituiria em um importante fator determinante da morbidade da doença e que a ruptura desta cadeia, pelo controle do vetor, influenciou positivamente no sentido de diminuir o risco de desenvolvimento de cardiopatia grave nos indivíduos infectados. Dentro desta proposta os estudos experimentais têm contribuído para esclarecer o papel das reinfecções sobre a morbidade da infecção pelo *T.cruzi*. Brumpt<sup>8</sup> foi o primeiro a demonstrar que animais infectados com *T. cruzi* e que sobreviviam à infecção passavam a apresentar forte imunidade à reinfecção. Desde então, vários outros autores vêm estudando o papel das reinoculações de *T.cruzi* no desenvolvimento da doença<sup>2 7 13</sup>.

Andrade e cols<sup>2</sup>, em 1974, estudaram a resposta às infecções repetidas, com as cepas Colombiana e Y, 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, e caracterizados se acordo com os parâmetros biológicos, demonstrando que a resistência à reinoculação é apenas relativa e o parasito reinoculado pode sobreviver<sup>2</sup>. Em 1984, Deane e cols<sup>10</sup>, puderam identificar diferentes cepas do *T.cruzi* em

camundongos submetidos a reinfecções, pela caracterização do seu esquizodema. Há, portanto, a possibilidade de coexistência de mais de uma cepa em um mesmo hospedeiro e de que hajam múltiplas infecções, quer seja com a mesma cepa ou com diferentes cepas. Estudos de Bustamante<sup>9</sup>, em camundongos submetidos a infecções sucessivas, com uma única cepa demonstraram que a parasitemia dos animais reinfetados apresentava picos elevados quando comparado a animais com infecção única. Verificaram estes autores a presença de infiltrado mononuclear com áreas de necrose e fibrose no miocárdio, sugerindo que a persistência do parasito está envolvida na exacerbação da doença..

Recentemente, 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<sup>3</sup>. A intensidade das lesões determinadas no animal experimental com múltiplas infecções foi avaliada, e os infiltrados inflamatórios quantificados através estudo morfométrico. 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<sup>1</sup>: cepa Y (Tipo I), cepa 21 SF (Tipo II), cepa Colombiana (Tipo III). Os biotipos têm características bem definidas que permitem caracterizar e re-isolar as cepas nos animais com múltiplas infecções. Os biotipos tipos II e III correspondem respectivamente aos taxa *T. cruzi* II e *T. cruzi* I de acordo com classificação proposta em 1999<sup>4</sup>. O biotipo Tipo I não está incluído nesta classificação e corresponde ao zimodema Z2b. No referido estudo foram utilizados 58 camundongos cronicamente infectados com a cepa Colombiana (1<sup>a</sup> infecção), que foram sucessivamente reinfetados, como a seguir: 1<sup>o</sup> Grupo – reinfetados com a cepa 21SF seguido pela cepa Y. 2<sup>o</sup> Grupo - reinfetados com a cepa Y, seguido da cepa 21SF. 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 inoculado nos animais com dupla infecção um terceiro inoculo 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. Houve baixa mortalidade naqueles grupos que foram reinoculados na fase crônica, variando de 0 a 10%. Para o estudo histopatológico os camundongos de cada grupo foram sacrificados ao final do experimento, por exsanguinação após anestesia. Foi realizada hemocultura do

1. Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunidade celular. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz. Rua Valdemar Falcão – 121 (Brotas) Salvador, BA.

sangue coletado dos animais de cada grupo e as formas de cultura foram usadas para caracterização isoenzimática.

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.

O isolamento das cepas dos animais com tríplice infecção foi obtido por passagens sucessivas em camundongos em três diferentes esquemas: cada 7 dias para isolamento da cepa Y, cada 14 dias para isolamento da cepa 21 SF e cada 30 dias para a cepa Colombiana.

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, na ausência de parasitos. 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. 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.

O exame isoenzimático demonstrou diferentes perfis eletroforéticos, revelando a presença predominante da cepa Z2b (Y) e da Z1 (Colombiana) nas enzimas ALAT, PGM e GPI e da cepa Z2 (21 SF) em ASAT.

Ficou demonstrado que a resistência desenvolvida a uma reinoculação é parcial e 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 predominante da cepa Y pelo estudo isoenzimático na tríplice infecção sugere que esta cepa do Biodema Tipo I, 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. O mesmo ocorreu com as cepas 21 SF e Colombiana que foram reveladas nos animais com tríplice infecção. A exacerbação das lesões inflamatórias em miocárdio e músculo esquelético sugere uma estimulação pelas infecções sucessivas, nos animais com tríplice infecção, da resposta imunológica celular.

Disto decorre a grande importância de um efetivo e contínuo controle da transmissão da infecção não apenas pelo combate ao vetor domiciliado como pela vigilância contínua no sentido de evitar que novas espécies venham a se domiciliar em decorrência de vários fatores de desequilíbrio ecológico.

## REFERÊNCIAS

1. Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Bahiano. Rev. Patol. Trop 3: 65-121, 1974.
2. Andrade SG, Carvalho ML, Figueira RM, Andrade ZA. Recuperação e caracterização de tripomastigotas inoculados em animais imunes. Reinoculação com diferentes cepas do *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop São Paulo 12: 395-402, 1970.
3. Andrade SG, Campos RF, Sobral KSC, Magalhães JB, Guedes RSP, Guerreiro ML. Reinfections with strains of different biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. Rev. Soc. Bras. Med. Trop 39: 1-8, 2006.
4. Anonymous. Recommendations from a Satellite Meeting. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94: 429-432, 1999.
5. Barrett TV, Hoff R Mott KE, Guedes F, Sherlock IA. 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.
6. 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.
7. Brener Z. Alguns aspectos da imunidade adquirida em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop 9: 233-238, 1967.
8. 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.
9. Bustamante JM, Rivarola HW, Fernández AR, Enders JE, Fretes R, Palma JA, Paglini-Oliva PA. *Trypanosoma cruzi* reinfections in mice determine the severity of cardiac damage. Int. J. Parasitol 32: 889-896, 2002.
10. Deane MP, Souza MA, Pereira NM, Gonçalves M, Momem H, Morel CM. *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods selected individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analysis. Journal of Protozoology 31: 276-180, 1984.
11. Diotaiuti, L Pereira AS, Loiola CF, Fernandes AJ, Schofield JC, Dujardin JP, Dias JC, Chiari E. Inter-relation 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.
12. Pinto Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin-America – A review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97: 603-612, 2002.
13. 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.