

## ARTIGOS

# INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE MACACOS *CEBUS APPELLA* SP PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*. AVALIAÇÃO CLÍNICA, ELETROCARDIOGRÁFICA E ANATOMOPATOLÓGICA.

Eros Antonio de Almeida, Maria Regina Navarro, Maria Elena Guariento e Sílvio dos Santos Carvalho.

*Dos trinta e dois macacos capturados no interior do Estado de São Paulo e mantidos em laboratório em gaiolas individuais (24 a 25 C° e 70% de umidificação) após vários xenodiagnósticos negativos, 12 foram infectados por via intraperitoneal com diferentes cepas de Trypanosoma cruzi, cujas formas tripomastigotas injetadas variaram de 1.10<sup>5</sup> a 5.10<sup>6</sup>. Os 20 macacos restantes foram mantidos como controle. No período de 1 a 6 anos tanto os animais inoculados como os não inoculados, foram submetidos a xenodiagnóstico e teste sorológico de aglutinação direta, exame clínico e o eletrocardiograma. Posteriormente os macacos foram necropsiados e todos os órgãos submetidos a exame macro e microscópico. O exame clínico e o eletrocardiograma não revelaram alterações. Dos 12 macacos infectados, 4 apresentaram evidências de infecção ao exame histopatológico: um com formas amastigotas nos tecidos e 3 com miocardite crônica de grau leve. A parasitemia foi comprovada em 66,66% dos animais na fase aguda e a sorologia em 91,66% na fase crônica. Concluiu-se que os macacos Cebus não expressaram susceptibilidade ao desenvolvimento das lesões que caracterizam a fase crônica da doença de Chagas mas poderiam ser usados para manter as cepas de T. cruzi estudos de pesquisa sorológico a longo termo.*

*Palavras-chaves: Modelo macaco. Doença de Chagas. Eletrocardiograma.*

Inúmeros são os trabalhos sobre a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* desde a descoberta da tripanosomose cruzi por Carlos Chagas<sup>15</sup>. Os objetivos dessas pesquisas sempre foram conhecer melhor o comportamento deste parasita, sobretudo a sua ação etiopatogênica<sup>12,13,27</sup>, assim como a resposta do hospedeiro frente à agressão, substanciados pelos estudos de Köberle<sup>19, 20</sup> e Köberle e Nador<sup>21</sup>, sobre as alterações clínicas e anatomopatológicas da doença.

São vários os animais de experimentação utilizados para o estudo da doença de Chagas. Os roedores, ratos e camundongos, têm sido os mais frequentes, contudo estão longe de permitir que se estabeleça uma identidade de comportamento com o ser humano devido à grande diferença existente entre estas espécies e o homem.

O grupo de primatas é tido como reservatório silvestre do *T. cruzi*<sup>1, 2, 3, 11</sup>. Carvalho e Barreto<sup>14</sup> identificaram um protozoário semelhante ao *T. cruzi* em macacos *Cebus apella* capturados em matas do interior do Estado de São Paulo e apontaram esta espécie como um hospedeiro natural do *T. cruzi* de importância epidemiológica.

Chaia e cols<sup>16</sup> estudaram a parasitemia em macacos *Cebus apella* experimentalmente infectados e visando complementar tais estudos, neste trabalho apresentamos os resultados de pesquisa sobre o comportamento clínico, eletrocardiográfico e anatomopatológico de um grupo destes animais, submetidos à infecção em laboratório por diferentes cepas de *T. cruzi*.

## MATERIAL E MÉTODOS

1. *Seleção e infecção dos macacos.* Foram utilizados 32 macacos *Cebus apella* sp de ambos os sexos, capturados no interior do Estado de São Paulo, mantidos em gaiolas individuais (24-26°C, umidificação 70%), com água e alimento ad

Grupo de Estudos da Doença de Chagas (GEDOCh), Universidade Estadual de Campinas e Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Centro de Pesquisa Johnson & Johnson, Campinas, SP.

Endereço para correspondência: Dr. Eros Antonio de Almeida. R. Prof. Jorge Nogueira Ferraz, 13/74, Jd. Chapadão, 13070-120 Campinas, SP.

Recebido para publicação em 22/07/91.

*libitum*. Destes animais, 12 foram inoculados com diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*, por via intraperitoneal com formas tripomastigotas ( $1.10^5$  a  $5.10^6$ ) provenientes de sangue de camundongos previamente infectados. Dos 12 animais, quatro foram infectados com a cepa Y (nos. 7, 8, 9 e 10) dois com a Colombiana (nos. 2 e 11), dois com a F (nos. 1 e 3), e os quatro restantes individualmente com as cepas Argentina (no. 12), Peruana (no. 4), São Felipe (no. 5) e CL (no. 6). Vinte macacos foram mantidos como grupo controle não infectados.

2. **Eletrocardiograma e exame clínico.** Os eletrocardiogramas foram realizados após sedação com stesmil (azaperone-4-fluoro-(4-2-pipidil) - 1 piperazinil butiroferona), na dose de 0,1 ml/kg, por via intramuscular. Agulhas hipodérmicas foram adaptadas aos eletrodos do eletrocardiografo (FUKUDA DP-25) com a finalidade de fixá-las subcutaneamente às faces anteriores dos membros superiores e inferiores e a região torácica dos animais. Foram utilizadas as 12 derivações convencionais do eletrocardiograma e velocidade de 50 mm/seg. Dos 12 macacos infectados, em apenas 6 foi realizado eletrocardiograma antes da inoculação. Após a infecção em todos os macacos foi realizado eletrocardiograma variando de 2 a 4 por animal, os quais foram também submetidos a exame clínico periódico num período de 3 anos.
3. **Comprovação da parasitemia.** A partir do 3º, durante 30 dias após a inoculação, o sangue dos animais foi examinado entre lâmina e lamínula, ao microscópio (400 x), com o intuito de comprovar-se a presença do parasita.
4. **Xenodiagnóstico e testes sorológicos.** Em todos os animais foram realizados xenodiagnósticos com 3 ninfas do 4º. estágio de *Triatoma infestans* e teste de aglutinação direta com 2-mercaptoetanol antes da inoculação do *T. cruzi*. No período de 1 a 5 anos após a inoculação, os animais foram submetidos a xenodiagnósticos (1 a 97) e, também, a teste sorológico (2 a 61) de aglutinação direta com 2-mercaptoetanol.
5. **Anatomia patológica.** O sacrifício foi realizado por injeção intravenosa de clorofórmio. O macaco da cepa CL (no. 6) foi sacrificado após 6 meses de infecção, os da cepa F (no. 1 e 3) e da São Felipe (no. 5) com 1 ano e meio. Os da cepa

Colombiana (no. 2 e 11), os animais das cepas Peruana e Argentina (no. 4 e 12), com 2 anos e meio e finalmente os animais infectados com a cepa Y (no. 7, 8, 9 e 10) foram sacrificados após 6 anos de infecção. Todos os órgãos foram submetidos a exame macroscópico. Para o estudo microscópico os fragmentos foram fixados, incluídos, cortados e corados por hematoxilina-eosina.

## RESULTADOS

1. A análise dos traçados eletrocardiográficos antes e após a infecção não revelou alterações significativas quanto à frequência cardíaca (FC), à duração e morfologia do QRS, duração da onda P, intervalo PR, e às alterações na morfologia da onda T.
2. O exame clínico dos animais não revelou alterações em nenhuma das ocasiões em que foram examinados.
3. Os resultados referentes a exames de sangue para comprovação do parasita na fase aguda, xenodiagnóstico e testes sorológicos dos macacos infectados com *T. cruzi* bem como dos controles, estão sumarizados na Tabela 1.
4. À necrópsia, em nenhum dos animais, foram notadas alterações macroscópicas.
5. Quatro animais apresentaram alterações histopatológicas: um deles (cepa Argentina no. 12) com formas amastigotas em fibras miocárdicas não circundada por reação inflamatória e em outros três, infectados com a cepa Y (no. 7 e 9) e um com a CL (no. 6) verificou-se escasso infiltrado inflamatório mononuclear intersticial, caracterizando miocardite crônica de leve intensidade. No animal infectado com a cepa CL e em um dos infectados com a cepa Y (no. 7) além de terem sido observadas alterações no miocárdio, foi também notada infiltração linfocitária focal na musculatura lisa do tubo digestivo e na região do plexo nervoso intramural do esôfago, com aparente diminuição do número de neurônios.

## DISCUSSÃO

A doença de Chagas tem sido exaustivamente

Tabela 1 - Quadro de infecção pelo *T. cruzi* em macacos *Cebus apella*.

| Macaco<br>n° | Cepa       | N° de T.<br><i>cruzi</i> p/kg | Infecção |      | Tempo<br>(meses) | Fase<br>aguda da<br>parasi-<br>temia | Fase crônica |                   |                 |              | ECG       |                        |
|--------------|------------|-------------------------------|----------|------|------------------|--------------------------------------|--------------|-------------------|-----------------|--------------|-----------|------------------------|
|              |            |                               | Data     | Fase |                  |                                      | n°           | xeno<br>positivos | %               | n°           |           | sorologia<br>positivos |
| 5            | S. Felipe  | 1.10 <sup>5</sup>             | 13/12/79 | 19   | Positiva         | 1(ai)<br>16(pi)                      | 0/1<br>15/16 | 0<br>93,7         | 1(ai)<br>17(pi) | 0/1<br>16/17 | 0<br>94,1 | 1 ai<br>3 pi           |
| 6            | CL         | 5.10 <sup>5</sup>             | 15/01/79 | 7    | Positiva         | 1                                    | 1/1          | 100,0             | 2               | 2/2          | 100,0     | 1 ai<br>1 pi           |
| 2            | Colombiana | 5.10 <sup>2</sup>             | 27/09/78 | 32   | Negativa         | 18                                   | 0/18         | 0                 | 10              | 0/10         | 0         | 2 pi                   |
| 11           | Colombiana | 5.10 <sup>5</sup>             | 24/11/78 | 30   | Negativa         | 17                                   | 0/17         | 0                 | 16              | 4/16         | 25,0      | 1 ai<br>3 pi           |
| 1            | F          | 1.10 <sup>5</sup>             | 26/09/79 | 16   | Negativa         | 11                                   | 0/11         | 0                 | 1(ai)<br>16(pi) | 0/1<br>10/16 | 0<br>62,5 | 1 ai<br>1 pi           |
| 3            | F          | 1.10 <sup>5</sup>             | 28/11/79 | 19   | Negativa         | 1(ai)<br>10(pi)                      | 0/1<br>0/10  | 0<br>0            | 1(ai)<br>16(pi) | 0/1<br>6/16  | 0<br>37,5 | 1 ai<br>1 pi           |
| 7            | Y          | 5.10 <sup>6</sup>             | 18/06/75 | 72   | Positiva         | 23                                   | 23/23        | 100,0             | 14              | 14/14        | 100,0     | 3 pi                   |
| 8            | Y          | 1.10 <sup>6</sup>             | 02/01/75 | 72   | Positiva         | 19                                   | 19/19        | 100,0             | 15              | 15/15        | 100,0     | 3 pi                   |
| 9            | Y          | Via<br>palpebral              | 10/07/75 | 60   | Positiva         | 19                                   | 19/19        | 100,0             | 11              | 11/11        | 100,0     | 3 pi                   |
| 10           | Y          | 5.10 <sup>5</sup>             | 02/06/75 | 72   | Positiva         | 16                                   | 16/16        | 100,0             | 21              | 18/21        | 85,7      | 3 pi                   |
| 4            | Peruana    | 5.10 <sup>5</sup>             | 23/01/79 | 29   | Positiva         | 17                                   | 2/17         | 11,7              | 15              | 15/15        | 100,0     | 1 ai<br>2 pi           |
| 12           | Argentina  | 5.10 <sup>5</sup>             | 01/02/79 | 29   | Positiva         | 17                                   | 4/17         | 23,5              | 15              | 15/15        | 100,0     | 4 pi                   |

pi = posterior à infecção    ai = antes da infecção    ECG = eletrocardiograma

estudada em primatas, principalmente em macacos *Rhesus* infectados com diferentes cepas<sup>17 22 23 24 28</sup>. Neste tipo de animais têm sido encontradas anormalidades eletrocardiográficas e anatomopatológicas atribuíveis à tripanosomose.

Nossas observações em *Cebus apella*, indicam que apenas 3 macacos apresentavam lesões inflamatórias de pequena monta no tubo digestivo e miocárdio, embora 8 dos 12 animais inoculados revelassem positividade ao xenodiagnóstico e todos apresentassem títulos positivos para reação sorológica (Tabela 1). Cremos que foi por esta razão que não verificamos alterações eletrocardiográficas, uma vez que se admite que estas estão intimamente ligadas ao acometimento histopatológico do miocárdio, do sistema de condução cardíaca e do sistema nervoso neurovegetativo, muito bem demonstrado em estudos de correlação na patologia humana<sup>4 6 9 25 26</sup> e experimental, em outras espécies animais<sup>5 7 8 29</sup>.

Os resultados obtidos em nosso experimento são semelhantes aqueles observados por Torres e Tavares<sup>30</sup>, que usando macacos *Cebus* após inoculações repetidas, não conseguiram reproduzir as lesões fibroinflamatórias da doença de Chagas e constataram ser este primata relativamente resistente à infecção tripanosômica. Entretanto nossas observações e as de Torres e Tavares<sup>30</sup>, divergem daquelas de Bolomo e cols.<sup>10</sup> e de Falasca e col.<sup>18</sup> que relatam alterações eletrocardiográficas comuns à cardiopatia chagásica humana ou sejam: bloqueio de ramos e fascículos, alterações de repolarização, sobrecarga ventricular e extra-sístoles supraventriculares. Os primeiros autores utilizaram aspartato de Agimalina que causa depressão da condução intraventricular para demonstração de tais alterações. O infiltrado inflamatório verificado por Bolomo e col.<sup>10</sup> foi infrequente e em pequenos focos e não se detectou formas amastigotas de *T. cruzi*. No tracto digestivo havia a presença de megacólon grave em dois animais embora não tenham encontrado inflamação, nem diminuição do número de neurônios no plexo parassimpático intramural.

Considerando as observações desses autores, estranha-se o fato dos animais apresentarem tais alterações eletrocardiográficas e, no entanto, possuírem leves alterações inflamatórias. Carece de explicação também o fato dos macacos apresentarem

megacólon, mantendo a integridade do sistema nervoso intramural, já que se aceita que a colopatia chagásica se dá em decorrência da lesão ganglionar nervosa<sup>19 20 21</sup>. Todavia, existe diferença metodológica entre o estudo em pauta e o de Falasca e col.<sup>18</sup> no que se refere ao tipo de cepas utilizadas. Estes autores inocularam seus animais com a cepa CA1, Thlahuen e Colombiana e nós, em apenas dois animais, usamos a cepa Colombiana. Dos estudos de Andrade<sup>5</sup> sabe-se que cepas diferentes levam a diferentes graus de lesões e, portanto, pode ser que esta seja uma justificativa para os diferentes resultados encontrados nos dois experimentos.

Nossas observações expressam pouca susceptibilidade dos macacos *Cebus apella* ao desenvolvimento das lesões habituais que caracterizam a fase crônica da doença de Chagas humana. Entretanto, estes primatas mostraram ser um excelente hospedeiro do *T. cruzi* para estudos experimentais, mesmo não apresentando dano miocárdico intenso ou alterações eletrocardiográficas até a época da necrópsia, pois revelavam a presença do *T. cruzi* quer por xenodiagnóstico quer por reação sorológica.

## SUMMARY

*Thirty two monkeys were captured and adapted to laboratory conditions captives isolated. They were submitted to multiple xenodiagnosis which were negative. Twelve were infected intraperitoneally with different strains of T. cruzi (1.10<sup>5</sup> to 5.10<sup>6</sup>). Twenty were the control group. Between on to six years both the control group and the infected monkeys, were submitted to xenodiagnosis, serological testing clinical examination and electrocardiography. The clinical examination and the electrocardiogram were always normal. The monkey were autopsied and histological examination detected in the infected group four monkeys with evidence of disease: one with parasites in the tissue and three with chronic myocarditis. Parasitaemia was in 66.66% of the monkeys in the acute phase and the sorology was positive in 91.66% in the chronic phase. The authors concluded that Cebus monkeys were not susceptible to the development of the disease but they could be utilized to maintain of such strains and studies of serological research in long terms infections.*

*Key-words: Primate model (Cebus apella. Chagas' disease. Electrocardiogram.*

## AGRADECIMENTO

Agradecimento especial ao Dr. Geraldo Chaia pelo auxílio na realização e interpretação da parte

experimental do estudo e a Márcia Cristina Gimenez Corrêa pelo trabalho datilográfico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albuquerque RDR, Barreto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXII - Infecção natural do símio *Callicebus nigrifrons* (Spix, 1823). Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 11:115-122, 1969.
2. Albuquerque RDR, Barreto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXVII - Infecção natural do símio *Callithrix penicillata jordani* (Thomas, 1904) pelo *T. cruzi*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 11:394-402, 1969.
3. Albuquerque RDR, Barreto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XL - Infecção natural do símio *Callithrix argentata melanura* (Geoffroy, 1812) pelo *T. cruzi*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 12:121-128, 1970.
4. Almeida HO, Miziara LJ, Prata SP, Frange PJ, Yamamoto I. Hemibloqueio anterior esquerdo e lesão vorticilar esquerda na cardiopatia chagásica crônica. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 28:293-298, 1975.
5. Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no recôncavo baiano (contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). Revista de Patologia Tropical 3:65-121, 1974.
6. Andrade Z, Andrade SG, Oliveira DR, Alonso DR. Histopathology of the conduction tissues of the heart in Chagas' myocarditis. American Heart Journal 95:316-324, 1978.
7. Anselmi A, Guardiel O, Juarez JA, Anselmi J. Disturbances in the AV conduction systems in Chagas' myocarditis in the dog. Circulation Research 20:56-64, 1976.
8. Anselmi A, Pifano F, Juarez AD, Vasquez AD, Anselmi J. Experimental *Schizotrypanum cruzi* myocarditis: correlation between histopathologic and eletrocardiographic findings in experimental Chagas' heart disease. American Heart Journal 20:638-656, 1965.
9. Bittencourt LAK, Carvalho SS, Miguel Jr A. Sobre a expressão eletrocardiográfica da lesão apical na cardiopatia chagásica. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 28:437-442, 1975.
10. Bolomo N, Milei J, Cossio PM, Segura E, Laguens RP, Fernandez L, Sarana RM. Experimental Chagas' disease in a South American primate (*Cebus sp*). Medicina (Buenos Aires) 40:667-672, 1980.
11. Bullok BC, Wolf RH, Clarkson TB. Myocarditis associated with trypanosomiasis in a *Cebus monkey* (*Cebus albifrons*). Journal American Medicine Association 151:920-922, 1967.
12. Carvalho SS. Considerações em torno da patogênese da moléstia de Chagas. Especial ênfase em relação à fase crônica. Revista da Associação Médica Brasileira 23:139-142, 1977.
13. Carvalho SS, Saad FA, Modesto NP. Considerações sobre a patogênese da moléstia de Chagas. Revista Goiana de Medicina 19:1-20, 1973.
14. Carvalheiro JR, Barreto MP. Estudos sobre o reservatório e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XIII Infecção natural do macaco *Cebus apella versutus* (Elliot, 1910) por *Trypanosoma* semelhante ao *T. cruzi*. Revista Brasileira de Biologia 26:101-114, 1966.
15. Chagas C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral dos estudos etiológicos e clínicos. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 3:219-274, 1911.
16. Chaia G, Abreu IB, Chiari L, Araújo SM. Infecção Experimental de macacos *Cebus apella* sp pelo *Trypanosoma cruzi* (cepa Y). I. Curva da parasitemia na fase aguda da doença de Chagas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical XI:81-85, 1977.
17. Davis DJ. Infection in monkeys with strains of *Trypanosoma cruzi* isolated in the United State. Public Health 58:1006-1010, 1934.
18. Falasca CA, Grana DR, Mareso EA, Gomez E, Gili MM. Eletrocardiographic changes in chronic *Trypanosoma cruzi* infected *Cebus apella* monkeys. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 56:287-292, 1991.
19. Köberle F. Patogênese dos megas. Revista Goiana de Medicina 2:101-110, 1956.
20. Köberle F. Patologia y anatomia patologica de la enfermedad de Chagas. Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana 51:404-428, 1961.
21. Köberle F, Nador E. Etiologia e patogenia do

- megaesôfago no Brasil (notas prévias). *Revista Paulista de Medicina* 47:643-660, 1955.
22. Marsden PD, Seah SKK, Draper CC, Pettitt LE, Miles MA, Voller A. Experimental *Trypanosoma cruzi* infections in *Rhesus monkeys*. II. The early chronic phase. *Transaction Royal Society Tropical Medicine Hygiene* 70:247-251, 1976.
  23. Marsden PD, Voller A, Seah SKK, Hankey C, Green D. Behaviour of a Peru strain of *Trypanosoma cruzi* in *Rhesus monkeys*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 4:177-182, 1970.
  24. Miles MA, Marsden PD, Pettitt LE, Draper CC, Watson S, Seah SKK. Experimental *Trypanosoma cruzi* infections in *Rhesus monkey*. III. Eletrocardiographic and histopathological findings. *Transaction Royal Society Tropical Medicine Hygiene* 73:528-532, 1979.
  25. Oliveira JAM. Pathologic anatomy of the His-Tawara system and eletrocardiographic abnormalities in chronic Chagas heart disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 25:17-25, 1972.
  26. Rosebaum MB. Chagasic myocardiopathy. *Progress Cardiovascular Diseases* 7:199-224, 1964.
  27. Santos RR, Oliveira JCR, Köberle F. Aspectos imunopatológicos da destruição neuronal na moléstia de Chagas. *Revista Goiana de Medicina* 22:235-243, 1976.
  28. Szarfman A, Laranha FS, Souza W, Quintão LG, Gercht D, Schmunis GA. Tissue reacting antibodies in a *Rhesus monkey* with long-term *Trypanosoma cruzi* infection. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 27:832-834, 1978.
  29. Taquini AC. Eletrocardiograma en la enfermedad de Chagas experimental. *Revista Argentina de Cardiologia* 8:115-121, 1942.
  30. Torres CM, Tavares BM. Miocardite no macaco *Cebus* após inoculações repetidas com *Schizotrypanum cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 56:85-119, 1958.