

EFFECTO DE LA REINFECCIÓN SOBRE LA EVOLUCIÓN DE RATAS INFECTADAS CON *Trypanosoma cruzi*¹

Silvia REVELLI (2), Héctor BERRA (3), José VALENTI (4), Hilda MORENO (5), María BERNASCONI (3), Hugo POLI (5) & Julio MORINI (2)

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comprobar si una de las variables medio-ambientales, la reinfección, puede modificar el comportamiento observado en un modelo de rata a nivel de parasitemia, anticuerpos séricos, manifestaciones electrocardiográficas y/o lesión miocárdica. Los grupos experimentales fueron: GI: ratas infectadas al destete con 1×10^6 *T. cruzi*; GR: igual a GI más reinfecciones cada 30 días hasta los 150 días post-infección inicial (p.i.i.); GI₁: ratas de 51 días infectadas; GT: testigos. Se detectó parasitemia alta en GI y GR hasta los 20 días p.i.i. tendiendo a negativizarse al día 30. En GR no se observaron parásitos después del primer reinóculo, resistencia que no es debida sólo a la mayor edad del huésped pues hubo parasitemia en GI₁. Los xenodiagnósticos fueron negativos en los tres grupos. Los anticuerpos séricos no se modificaron significativamente en GR respecto de GI, salvo en los anticuerpos 7S, pues los del GR presentaron títulos superiores en algunos de los días estudiados. Los ECG basales no mostraron cambios distintivos en las ratas infectadas. La prueba de ajmalina mostró una disminución de la FC independiente del tratamiento; el PR, QaT y QRS se prolongaron significativamente en todos los grupos respecto del basal ($p < 0.05$), salvo el QaT en el GT; además, el cambio de PR y QaT fue mayor en los infectados ($p < 0.05$). En los grupos infectados hubo también una amplia variación en la orientación del eje eléctrico respecto del valor basal, acompañado de cambios morfológicos más manifiestos en GR. La proporción de lesión cardíaca detectada histológicamente en los grupos infectados, fue significativamente superior a la del GT ($p < 0.01$). Se concluye que la reinfección no reproduce el cuadro agudo inicial y no modifica el tipo y grado de lesión cardíaca observada histológicamente. La prueba de ajmalina muestra cambios electrocardiográficos compatibles con daño miocárdico incipiente en las ratas infectadas y sugieren mayor compromiso en el grupo reinfectado.

UNITERMOS: *T. cruzi* — reinfección en ratas — ajmalina.

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas está ampliamente distribuida en Latinoamérica²⁶, presenta distintas variedades epidemiológicas y clínicas con frecuencia diferente de presentación según la zo-

(1) Trabajo realizado en la División Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe 3100, Rosario (2000), Argentina.

(2) Miembro de la Carrera del Investigador, UNR.

(3) Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR.

(4) Cátedra de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR.

(5) Miembro de la Carrera del Personal de Apoyo, CONICET.

na geográfica²¹, sugiriendo que la evolución natural de la enfermedad dependería de variables tales como: cepa del parásito presente¹, nutricionales⁸, características genéticas del huésped^{7, 15}, etc.

Otra variable medioambiental que podría influir en la evolución de la enfermedad es la reinfección. Cuando se estudiaron grupos etéreos homogéneos de individuos serológicamente positivos se verificó que el porcentaje de alteraciones electrocardiográficas compatibles con cardiopatía chagásica, resultó mayor en las personas con tiempo de residencia en zonas de alta endemicidad superior a los 20 años, respecto de aquellas que habían vivido menos de 5 años¹¹. Los autores sugieren que la posibilidad de reinfecciones por *T. cruzi* podría ser la causa de estas diferencias; sin embargo, no se puede excluir de este tipo de estudios clínicos el efecto de otros factores.

Los modelos animales que permiten controlar las variables en juego, podrían brindar un aporte al problema en cuestión. En los estudios de reinfección realizados en el ratón, no se demostró inmunidad concomitante, hubo reaparición de la parasitemia, mayor mortalidad e intensidad de lesiones musculares esqueléticas e intestinales, aunque no se modificó la incidencia e intensidad de las miocarditis⁶.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un modelo experimental en una línea de ratas que infectadas al destete con *T. cruzi*, reproduce a los 6 meses post-infección inicial (p.i.i.), algunas características de la infección chagásica crónica^{22, 23}. El objetivo de este trabajo fue comprobar si la reinfección, puede modificar el comportamiento observado en el modelo experimental sobre la parasitemia, anticuerpos séricos, el electrocardiograma y/o la histopatología miocárdica. Además, se utilizó la prueba de ajmalina para detectar presencia de daño cardíaco incipiente, incapaz "per se" de reflejarse en el ECG basal^{10, 18}.

MATERIAL Y METODOS

Animales — Se utilizaron ratas endocriadas de línea "1" de ambos sexos, de 21-25 días de edad, que se crían en nuestro bioterio desde 1963

y derivan de la línea "e", IIM (Supplement IV of the Int. Survey on the Supply, Quality and Use of Laboratory Animals, Int. Committee on Lab. Animals, Carshalton, England, 1964).

Infección experimental — Se realizó con la cepa Tulahuén de *Trypanosoma cruzi* que se mantiene por pasajes subcutáneos en ratones de 21 días de edad. Las ratas fueron infectadas en todos los casos con 1×10^6 tripomastigotes por vía subcutánea, ajustándose la concentración con NaCl 0,14 M; el número de parásitos/ml de sangre se determinó según la técnica descrita por BRENER⁵.

Grupos experimentales — GI: ratas infectadas a los 21 días de edad; GR: infectadas a los 21 días de edad y re infectadas cada 30 días hasta los 150 días p.i.i.; GT: testigos normales de igual sexo y edad que los infectados. Además, en los estudios de parasitemia se agregó el GI₁: ratas infectadas a los 51 días de edad.

Los animales permanecieron en las mismas condiciones ambientales y de alimentación durante todo el experimento.

Parasitemia — 1) Observación en fresco: las determinaciones se realizaron con sangre extraída de la cola a distintos tiempos p.i.i. La muestra obtenida con micropipeta heparinizada (5 μ l) se colocó entre porta y cubreobjeto (22 x 22 mm) y se estudió microscópicamente (450 x), expresándose el resultado como número de parásitos/100 campos. Los datos se analizaron con la prueba de la mediana considerando aceptable un valor de α (probabilidad de error tipo I) de 0.05. 2) Xenodiagnóstico: se realizó a los 6 meses p.i.i. con 10 ninfas de 3º estadio de *Triatoma infestans* por rata. Los insectos tenían 30 días de ayuno y se alimentaron durante 30 minutos. Las heces se analizaron a los 30 y 60 días post-repaso.

Anticuerpos séricos (Ac) — El suero fue obtenido de sangre de la cola de los animales, a distintos tiempos p.i.i. Se utilizó la técnica de microtitulación para las reacciones de: 1) aglutinación directa (AD), empleándose como antígeno epimastigotes de *T. cruzi* (Técnica Yanovsky, Laboratorios Polychaco SAIC) sin y con tratamiento previo de los sueros con 2-mercaptoe-

tanol (2-ME); el suero se incubó durante 30 minutos a 37°C en partes iguales de solución 1/100 de 2-ME en NaCl 0,14 M; 2) hemaglutinación indirecta (HAI), empleándose como antígeno hematies sensibilizados con fracciones solubles de *T. cruzi* (Técnica Averbach-Yanovsky, Laboratorios Polychaco); en todos los sueros se realizó la reacción con hematies no sensibilizados. Los resultados se expresaron como el \log_2 de la inversa de la máxima dilución del suero que dio reacción positiva (\log_2 del título), y se analizaron con la prueba "U" de Mann Whitney, considerando aceptable un valor de α (probabilidad de error de tipo I) de 0,05.

Electrocardiogramas (ECG) — Se efectuaron bajo anestesia con pentobarbital sódico (5 mg/100 g de peso corporal, vía i.p.), a los 180 días p.i.i., en condiciones basales, las derivaciones DI, DII, DIII, aVR, aVL, aVF y V₁, a una velocidad de papel de 50 mm/seg y 2N amplitud; y 1 minuto luego de inyectar por vía endovenosa (vena femoral a través de una pequeña incisión cutánea) 0,15 mg/100 mg de peso corporal de aspartato de ajmalina (Laboratorios Craveri), registrando continuamente DII los 10 minutos siguientes. En los trazados obtenidos se analizó: frecuencia cardíaca (FC), eje eléctrico, intervalos PR y QaT (este último medido desde el comienzo de la despolarización ventricular hasta la cúspide de la onda T), duración y morfología del QRS. Los resultados se analizaron con la prueba de rangos señalados y pares igualados de Wilcoxon, el análisis de la variancia de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis, la prueba de la probabilidad exacta de Fisher y Chi cuadrado. Para las diferencias entre grupos se consideró aceptable un valor de α (probabilidad de error de tipo I) de 0,05.

Histopatología de miocardio — Se realizó a los 180 días p.i.i.; los animales se sacrificaron en cámara de éter, se extrajo el corazón, se cortó en forma transversal y semiseriada, y los cortes se incluyeron en parafina. Luego se efectuaron cortes histológicos de 5 μ de espesor que se colorearon con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson. El estudio histopatológico se realizó a ciegas, siempre por el mismo observador y con el mismo criterio. Se estudiaron:

— Miocarditis crónica focal (MCF), determinada por la presencia de infiltrados de linfocitos

con destrucción de las fibras miocárdicas. Según el tamaño del foco inflamatorio se clasificó en, a) a focos pequeños, pequeño acúmulo de linfocitos con destrucción de 2-3 fibras miocárdicas; b) a focos de tamaño moderado, grupos de linfocitos con destrucción de pequeños grupos de fibras miocárdicas; c) a focos de gran tamaño, acúmulos mayores de histiocitos y linfocitos con destrucción de grupos grandes de fibras miocárdicas.

— Pericarditis (Pc), determinada por la presencia de un infiltrado inflamatorio crónico en el epicardio. Según el tamaño del foco inflamatorio se la clasificó en, a) a focos pequeños, pequeño grupo de linfocitos e histiocitos dispersos; b) a focos de tamaño moderado, cuando el infiltrado formaba una masa nodular pequeña; c) a focos de gran tamaño, cuando el infiltrado formaba una placa extensa.

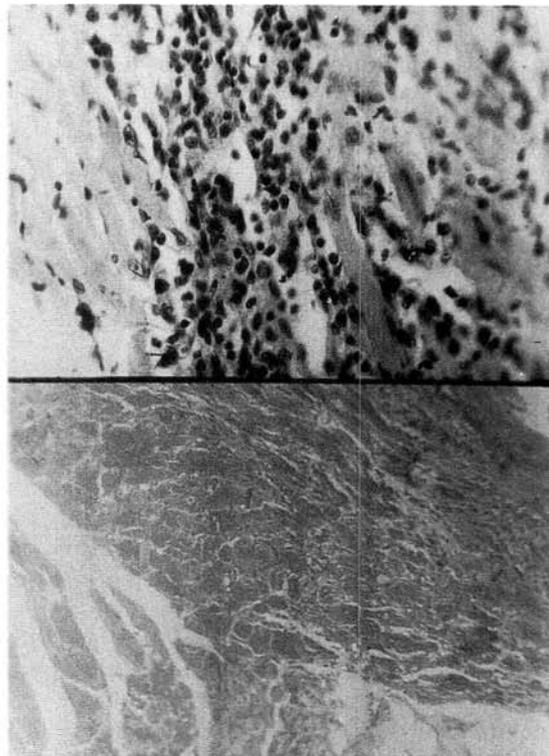


Foto 1 — Arriba: miocarditis crónica focal a focos de pequeño tamaño. Rata inoculada con *Trypanosoma cruzi*, músculo ventricular. Se observa un foco de linfocitos con algunos histiocitos que destruye un grupo de cuatro fibras miocárdicas. Abajo: miocardio ventricular de rata infectada con *Trypanosoma cruzi*. A la izquierda hay fibrosis perifibrilar, a la derecha una zona extensa de tejido fibroso denso que disocia las fibras musculares. Hay atrofia de miocélulas (trícromica).

— Fibrosis (Fi), determinada por la presencia de tejido conectivo reemplazando las fibras miocárdicas. Según el grado de desarrollo y la extensión en el miocardio se clasificó en leve, moderada e intensa.

Se consideró como lesión cardíaca (LC) la presencia de MCF, Pc y/o Fi. Los resultados se analizaron con la prueba de la probabilidad exacta de Fisher, considerando aceptable un valor de α (probabilidad de error tipo I) de 0,05.

RESULTADOS

La Fig. 1 muestra la evolución de la parasitemia en el GR desde el comienzo de la infección. La misma se detecta fácilmente durante los primeros 20 días p.i.i., tiende a negativizarse hacia los 30 días y no se observan parásitos después de la reinfección. El mismo comportamiento de los primeros 30 días corresponde al GI (datos no presentados), realizado separadamente. En el GI₁ la cantidad de parásitos es significativamente menor a la observada en los animales infectados al destete (ej: día 8 p.i.i. GR versus GI₁, $X^2 = 4,06$, $p < 0,05$; GR, día 38 p.i.i. versus GI₁, día 8 p.i.i., que corresponde a la misma edad de los animales, $p < 0,001$). Los xenodiagnósticos realizados a los 6 meses p.i.i. fueron negativos en los tres grupos.

La fig. 2 muestra la evolución de los Ac en GI y GR con la técnica de AD, cuyos niveles no se modificaron significativamente por efecto de la reinfección, salvo en los Ac 7S, donde los animales del GR presentan títulos significativamente superiores a GI en algunos de los días estudiados (50, 60, 120, 150 y 180 p.i.i.).

El estudio realizado por HAI no mostró diferencias entre GI y GR en ninguno de los días

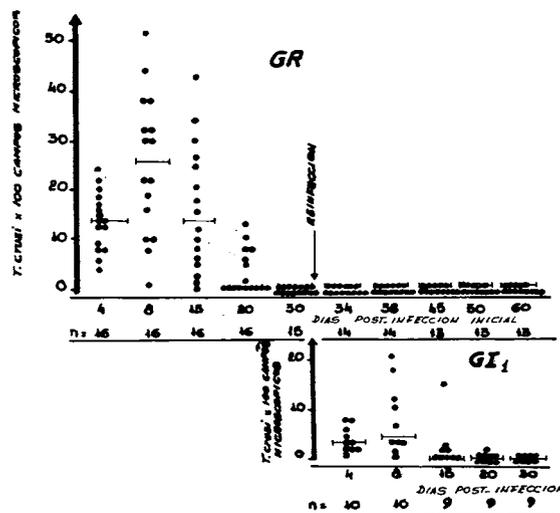


Fig. 1 — Parasitemia en ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*. GR: infectadas al destete y reinfectadas desde los 30 días post-infección inicial. GI₁: infectadas a los 51 días de edad. Cada punto es un dato individual. — mediana.

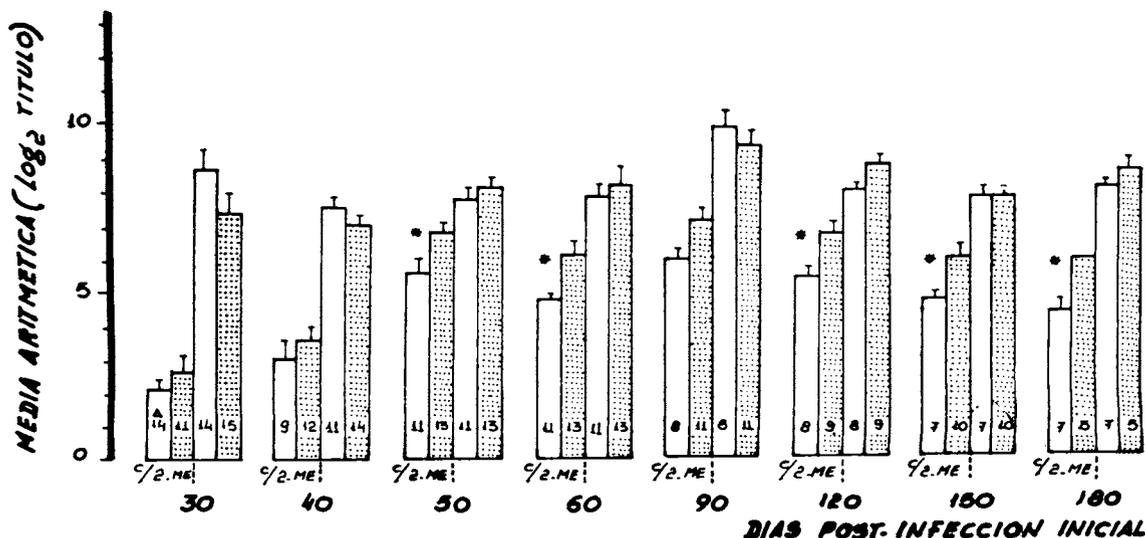


Fig. 2 — Evolución de los anticuerpos séricos en ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*. Aglutinación directa con y sin 2-ME. □: infectadas al destete (I). ▨: I + reinfectedas a los 30, 60, 90, 120 y 150 días post-infección inicial. T: error standard. An: n° de animales. *: diferencia estadísticamente significativa entre GI y GR.

estudiados (30, 40, 60, 90, 120, 150 y 180 p.i.i.; ej: día 60 GI, Media (\bar{x}) = 5.55, Rango (R) = 8-4, Error standard (e.s.) = 0.34, n = 11; GR, \bar{x} = 5,2, R = 7-4, e. s. = 0,26, n = 13).

ECG. En las Fig. 3 y 4 se puede observar que en condiciones basales, la FC, duración del PR, QRS, QaT, eje eléctrico y morfología del QRS no difirieron significativamente entre los grupos experimentales.

La prueba de ajmalina produjo una disminución de la FC en 18/24 animales independientemente del tratamiento previo (Fig. 3a). En la Fig. 3b se observa que el PR, QaT y QRS se prolongaron significativamente respecto del trazado basal en todos los grupos ($p < 0.05$), salvo el QaT en el GT; además, el cambio de PR y QaT fue significativamente mayor en los infectados ($p < 0.05$). En la Fig. 3c se verifica que el eje eléctrico no se modificó en 7 8 animales testigos y en el restante varió 10° respecto del basal y no se observaron cambios morfológicos; en cambio, en los grupos infectados varió hasta 80° (GI) y 105° (GR) respecto del valor basal, acompañándose

de cambios morfológicos compatibles con trastornos de conducción fascicular (como los observados en la Fig. 4), en 2/7 animales del GI y en 5/9 del GR (GT vs GI vs GR, $p < 0.05$; GI vs GR no significativo).

Histopatología de miocardio. La proporción de LC histológica no difirió entre GI (8/10 — 80%) y GR (14/15 — 93%) y fue significativamente superior a la del GT (0/12 — 0%), $p < 0.01$ en ambos casos. Las lesiones histopatológicas no mostraron diferencias significativas entre grupos ni en el tipo, ni en el grado que fue en MCF y PC a focos de pequeño tamaño y en Fi leve, en todos los casos. La MCF fue preferentemente ventricular, sin predominancia visible por ninguno de los ventrículos; la Fi fue a focos pequeños rodeando a veces a pequeños fascículos de fibras miocárdicas, o individualmente a miocélulas; ocasionalmente se observó algún foco de fibrosis retráctil muy pequeño; la fibrosis se encontró fundamentalmente en el músculo ventricular. La Pc mostró acúmulos focales pequeños de linfocitos con algunos histiocitos; a veces el infiltrado se insinuó entre algunas de las fibras miocárdicas más superficiales.

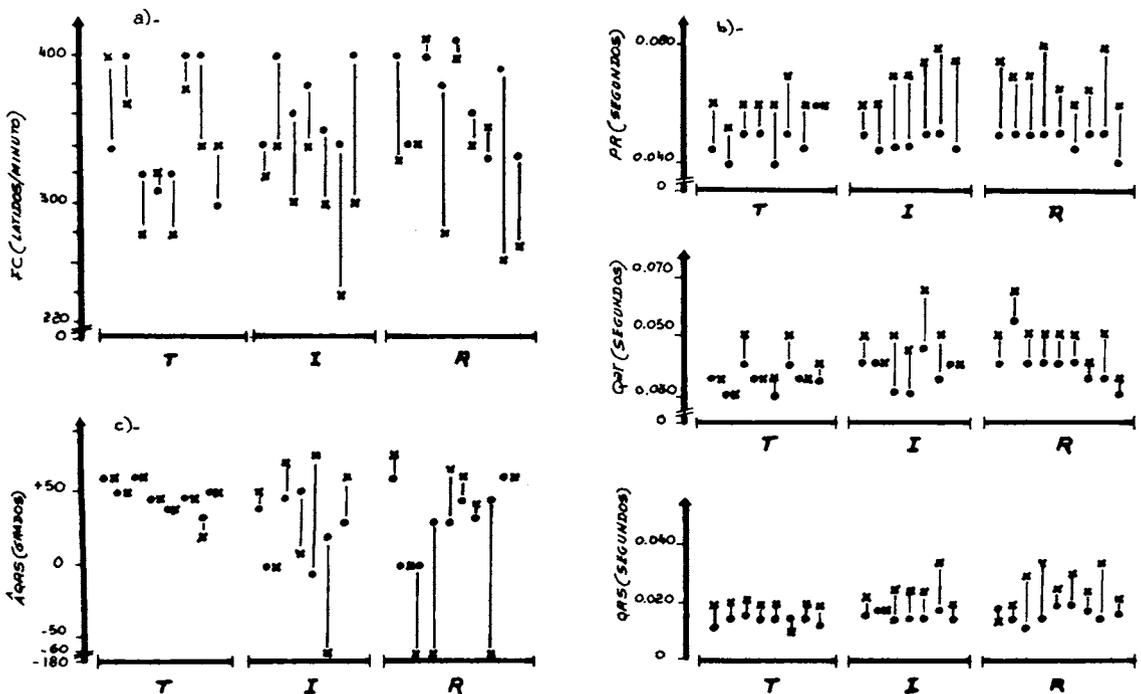


Fig. 3 — Efecto de la ajmalina sobre la frecuencia cardíaca (FC), PR, QaT, QRS y ÁQRS del ECG de ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*. T: testigos. I: infectadas al destete (I). R: I + reinfectadas a los 30, 60, 90, 120 y 150 días post-infección inicial. ● sin ajmalina. x: con ajmalina.

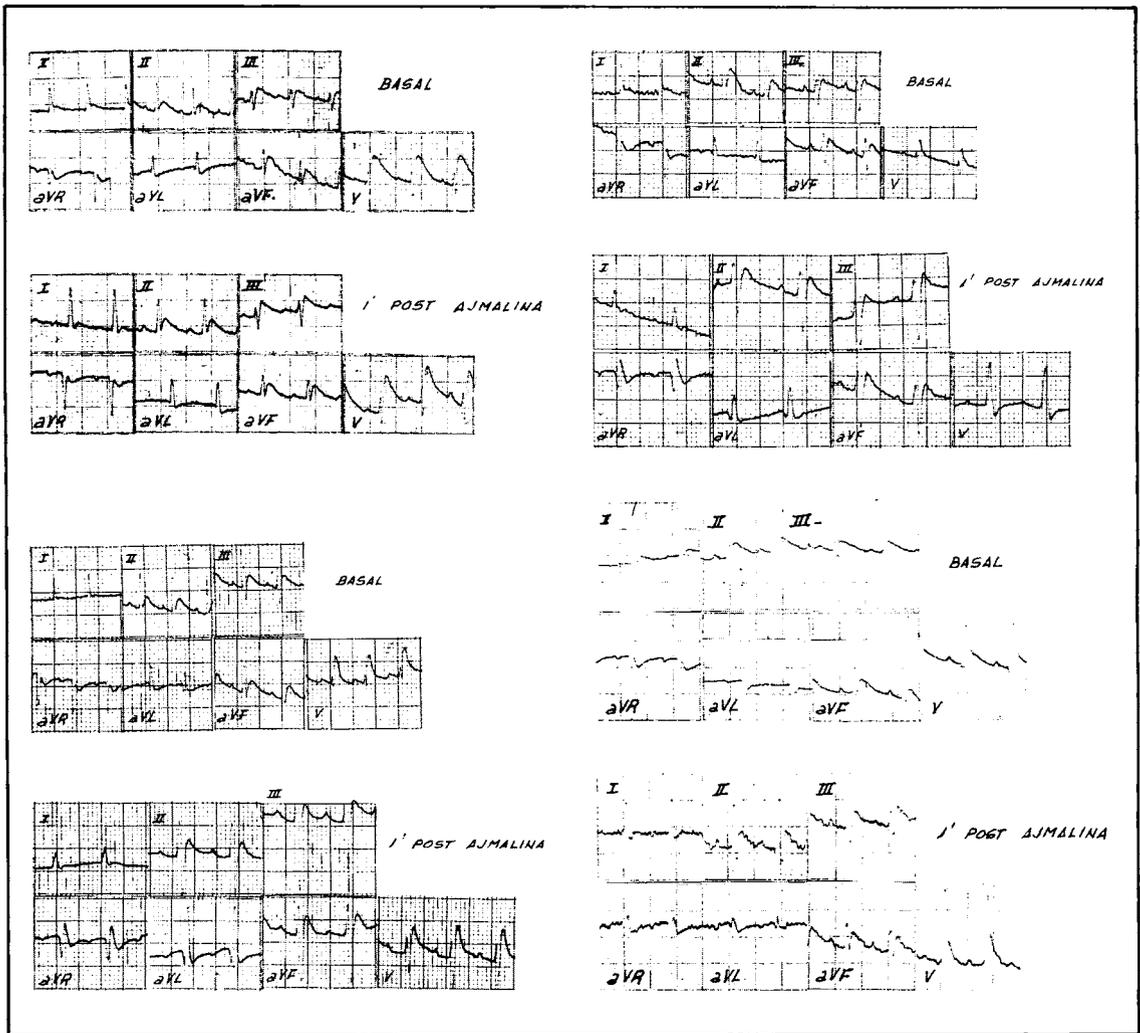


Fig. 4 — ECG de ratas infectadas y reinfectadas con *Trypanosoma cruzi* y testigo, bajo la acción de la ajmalina; a: ECG de una rata normal, 1 minuto post-ajmalina, que no muestra cambios significativos respecto del basal; b: ECG de una rata infectada, con desvío evidente del eje eléctrico en el plano frontal, e importante incremento de la onda R en derivación precordial, luego de la ajmalina; c, d: ECG de ratas reinfectadas que muestran alteraciones similares a las descritas en b.

DISCUSSION

Los resultados obtenidos en parasitemia muestran que existe resistencia a la reinfección y que ella no es debida solamente a la mayor edad del huésped; además, en el GR los niveles de Ac son levemente superiores, con diferencias mínimas y se presentan solo puntualmente. Todo esto indicaría que la reinfección no reproduce el cuadro agudo inicial; inclusive, cuando la reinfección se comenzó durante la etapa aguda de la enfermedad (8, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 días

p.i.i., datos no presentados), no se modificó el curso de las lesiones histológicas habituales en el corazón.

En el presente estudio no fueron observadas diferencias en la calidad o intensidad de las lesiones histológicas observadas en el miocardio en relación con distintas modalidades experimentales de infección, resultados similares a los que se obtuvieron en el ratón⁶. Por otra parte, tampoco se detectaron cambios distintivos en el ECG basal de los animales infectados, atribuibles a la presencia de focos inflamatorios, hecho

ya conocido^{22, 23}. En este sentido pensamos que el modelo semejaría el período indeterminado de la enfermedad, en donde la magnitud o ubicación de las lesiones miocárdicas no son suficientes para ponerse de manifiesto, como fuera postulado por varios autores^{2, 9, 10, 14, 17, 24}. BESTETTI y col.³, en un modelo de ratas infectadas con *T. cruzi*, describen cambios electrocardiográficos, no observados en nuestros animales. La cepa de parásitos y el esquema de infección utilizados pueden estar involucrados, determinando modalidades evolutivas distintas.

La prueba de ajmalina a sido utilizada en individuos infectados con *T. cruzi* para poner de manifiesto trastornos de conducción latentes¹⁰ y en algunos modelos experimentales, con el fin de evocar modificaciones electrocardiográficas de la cardiopatía humana^{12, 13, 18}. En nuestro modelo utilizando ajmalina se encontraron cambios en la duración del PR y QaT, y en la duración y morfología del QRS, combinados con amplia variación en la orientación del eje eléctrico y cambios morfológicos más manifiestos en GR (aunque estadísticamente no significativas), compatibles con trastornos de conducción intraventricular. Esta interpretación se apoya en la semejanza morfológica de estos trazados con los de otros modelos^{12, 13, 16, 18, 25} y con los ECG de pacientes con miocardiopatía chagásica. No obstante, no se conoce adecuadamente la anatomía del sistema de conducción de nuestros animales, a pesar de los estudios realizados en roedores^{4, 19, 20}, lo que impide visualizar en forma directa alguna lesión o compromiso del sistema de conducción.

El mecanismo por el cual la ajmalina produce estos cambios no se encuentra totalmente dilucidado¹⁰; podría provocar una potenciación del "daño" del sistema de conducción, insuficiente por si mismo para exteriorizarse en el ECG basal. La presencia de lesiones histopatológicas leves del miocardio permitiría postular cierto grado de compromiso del tejido de conducción, visualizable con la prueba de ajmalina, subyacente a las lesiones en el músculo.

Los resultados presentados sugerirían una tendencia a un mayor compromiso o alteración cardíaca en el grupo de reinfección, apoyados por los cambios electrocardiográficos evocados

por la ajmalina, cuya base no sea la lesión histopatológica miocárdica. Esto indicaría el papel importante que jugaría la reinfección en la evolución de la cardiopatía chagásica, así como la necesidad de profundizar el estudio en este campo, por otra parte, íntimamente relacionado con el control epidemiológico de la enfermedad humana.

SUMMARY

Effect of reinfection on the evolution of rats infected with *Trypanosoma cruzi*.

The present study was undertaken in order to demonstrate that reinfection could modify parasitemia, serum antibodies, electrocardiographic patterns and/or myocardial lesions already observed in a rat model. Experimental groups IG: rats infected at weaning with 1×10^6 *T. cruzi*; RG: same as IG plus reinoculations each 30 days until completion on day 150; IG₁: 51 day old infected rats; C: controls. A high parasitemia was detected in IG and RG until day 20 showing a tendency to become negative on day 30. No parasites were observed in RG after the first reinoculation which could not be attributed to the old age of the host since there was no parasitemia in IG₁. Xenodiagnoses were negative in all three groups. Serum antibodies were not significantly modified in RG in comparison with IG, except for 7S antibodies, since RG showed higher titres in some days under study. No distinct patterns of basal ECG were observed in infected rats. The ajmalina test reduced the heart rate (HR) showing no treatment dependence. The PR, QaT and QRS were significantly lengthened in all groups regarding the basal one ($p < 0.05$), except for the QaT in C. Besides, the PR and QaT alterations were greater in the infected rats ($p < 0.05$). There was also present a wide variety of electric axis orientations, regarding the basal value, accompanied by morphological changes more evident in the RG. The incidence of cardiac lesions histologically detected in the infected group was significantly higher than in C ($p < 0.01$). It can be concluded that reinfection, neither produce the onset of acute initial disorders nor modify the type or degree of cardiac lesion histologically observed. The ajmaline test showed ECG alterations compatible with a mild myocardial damage in infected rats, whereas a

major compromise was assessed in the reinfected group.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en parte con apoyo del Consejo de Investigaciones y de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR. Los autores agradecen al Dr. J. Yanovsky (Lab. Polychaco) por la donación de reactivos para las pruebas serológicas, al Dr. Stoka (INDIECH) por la provisión de los triatominos, al Sr. H. Berra por su labor técnica, a la Sra. C. L. Revelli por el asesoramiento estadístico y a la Srta. B. Scelfo, por su labor de secretaría.

REFERENCIAS

1. ANDRADE, S. G.; ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; MAGALHÃES, J. B. & BARRAL NETTO, M. — Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 79: 397-407, 1985.
2. ANDRADE, Z. A. — Aspectos de la patogenia de la enfermedad de Chagas. Simposio Latinoamericano sobre enfermedad de Chagas. *Rev. Fed. argent. Cardiol.*, 17: 155-165, 1988.
3. BESTETTI, R. B.; SOARES, E. G.; SALES-NETTO, V. N.; ARAUJO, R. C. de & OLIVEIRA, J. S. M. — The resting electrocardiogram of *T. cruzi* infected rats. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 29: 224-229, 1987.
4. BOMPIANI, G. D.; ROUILLER, C. H. & HATT, P. Y. — Le tissu de conduction du coeur chez le rat. Etude au microscope électronique. I. Le tronc commun du faisceau de His et les cellules claires de l'oreillette droite. *Arch. Mal. Coeur.*, 52: 1257, 1959.
5. BRENER, Z. — Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 4: 389-396, 1962.
6. CABEZA MECKERT, P. & LAGUENS, R. P. — Chronic Chagas disease in the mouse: III. Absence of concomitant immunity after repeated infections. *Medicina (B. Aires)*, 41: 543-548, 1981.
7. CARDONI, R. L.; RIMOLDI, M. T.; ESTEVA, M. & BRACCO, M. E. de — Humoral antibody response in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (B. Aires)*, 46: 435-439, 1986.
8. CARLOMAGNO, M. A.; RIARTE, A.; MORENO, M. & SEGURA, E. L. — Effects of calorie restriction on the course of *Trypanosoma cruzi* infection. *Nutr. Res.*, 7: 1031-1040, 1987.
9. CARRASCO GUERRA, H. A.; PALACIOS PRU, E. & DAGERT DE SCORZA, C. — La biopsia miocárdica: sus aportes al conocimiento sobre la enfermedad de Chagas. *Interciencia*, 13: 296-302, 1988.
10. CHIALE, P. A.; PRZYBYLSKI, J.; LAINO, R. A.; HALPERN, M. S.; SANCHEZ, P. A.; GABRIELLI, A.; ELIZARI, M. V. & ROSENBAUM, M. B. — Electrocardiographic changes evoked by ajmaline in chronic Chagas' disease without manifest myocarditis. *Amer. J. Cardiol.*, 49: 14-20, 1982.
11. DAVILA, H.; BELOSCAR, J. S.; BOTTASSO, O. A. & MORINI, J. C. — Alteraciones electrocardiográficas en individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* con distinto tiempo de residencia en áreas de alta endemicidad. *Medicina (B. Aires)*, 47: 154-158, 1987.
12. FALASCA, A.; GRANA, D.; BUCCOLO, J.; GILI, M.; MERLO, A.; ZOPPI, J. & MARESO, E. — Susceptibilidad del mono *Cebus apella* a la inoculación de distintas cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Bol. ofic. sanit. panamer.*, 102: 555-576, 1987.
13. GONZALEZ CAPPA, S.; LAZZARI, J.; SEGAL, A.; KATZIN, A.; MISTCHENKO, A.; LAGUENS, R. P. & ELIZARI, M. — Infección experimental del conejo con *Trypanosoma cruzi*. II. Correlación entre el electrocardiograma y la histopatología. *Medicina (B. Aires)*, 37: 508-509, 1977.
14. GORODNER, O. L. de; MENDIVIL, G. T.; RISSO, A.; RISSO, J. J.; PETRAGLIA, G.; FRANCESCO, C. de & BUSTAMANTE, A. — Enfermedad de Chagas natural en perros. Estudios serológicos, anatomopatológicos y electrocardiográficos de la fase crónica indeterminada de la infección. *Medicina (B. Aires)*, 45: 535-538, 1985.
15. KIERSZENBAUM, F. & HOWARD, J. G. — Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *J. Immunol.*, 116: 1208-1211, 1976.
16. LAGUENS, R. P.; CABEZA MECKERT, P.; BASOMBRIO, M. A.; CHAMBO, G.; COSSIO, P.; ARANA, R. & GELPI, R. J. — Chronic Chagas disease in the mouse. I. Electrocardiographic and morphological patterns of the cardiopathy. *Medicina (B. Aires)*, 41: 35-39, 1981.
17. LARANJA, F. S.; DIAS, E.; NOBREGA, G. & MIRANDA, A. — Chagas' disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation*, 14: 1035-1059, 1956.
18. MEIRA DE OLIVEIRA, J. S.; BULGARELLI BESTETTI, R.; GARCIA SOARES, E. & MARIN NETO, A. — Ajmaline-induced electrocardiographic changes in chronic *Trypanosoma cruzi* infected rats. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 80: 415-419, 1986.
19. MOLINA, H. A.; MILEI, J.; RIMOLDI, M. T.; GONZALEZ CAPPA, S. M. & STORINO, R. A. — Histopathology of the heart conducting system in experimental Chagas disease in mice. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 82: 241-246, 1988.
20. PRAKASH, R. — The heart of the rat with special reference to the conducting system. *Amer. Heart J.*, 47: 241-251, 1954.

REVELLI, S.; BERRA, H.; VALENTI, J.; MORENO, H.; BERNASCONI, M.; POLI, H. & MORINI, J. — Efecto de la reinfección sobre la evolución de ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 32(4): 260-268, 1990.

21. PRATA, A. — Significance of *Trypanosoma cruzi* differentiation and selection, relation ship with clinical and epidemiological varieties. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 18 (suppl.): 9-16, 1985.
22. REVELLI, S. S.; AMERIO, N.; MORENO, H. S.; VALENTI, J. L.; BALBARREY, H. & MORINI, J. — Enfermedad de Chagas crónica en la rata. Características serológicas, electrocardiográficas e histopatológicas. *Medicina (B. Aires)*, 40: 69-76, 1980.
23. REVELLI, S.; MORENO, H.; BERRA, H.; VALENTI, J. L.; NOCITO, A. L.; AMERIO, N. & MORINI, J. — Influencia de la edad de la rata en la evolución de la infección con *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (B. Aires)*, 47: 360-366, 1987.
24. ROSENBAUM, M. B. — Chagasic myocardiopathy. *Progr. cardiovasc. Dis.*, 7: 199-225, 1964.
25. SADIGURSKY, M. & ANDRADE, S. G. — Electrocardiographic changes in experimental chronic murine Chagas' disease. *Braz. J. med. biol. Res.*, 19: 379-388, 1986.
26. TROPICAL DISEASE RESEARCH. Seventh Programme Report. Geneva, World Health Organization, 1985. cap. 6, p. 3-4.

Recebido para publicação em 19/10/1989.