

## ARTIGOS

### EVOLUÇÃO DA CARDIOPATIA EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA EM COELHOS INFECTADOS COM *TRYPANOSOMA CRUZI*

Florêncio Figueiredo\*, Marcos A. Rossi\* e Ricardo R. Santos\*\*

*Coelhos jovens de ambos os sexos (1-2 meses de idade), outbred, inoculados com tripomastigotas da cepa Colômbia de Trypanosoma cruzi desenvolveram lesões cardíacas, macro e microscópicas, além de características parasitológicas e imunológicas, muito semelhantes às observadas na doença de Chagas humana, tanto na fase aguda como na fase crônica. Na fase aguda a síndrome cardíaca caracteriza-se macroscopicamente por discreta cardiomegalia, com dilatação de câmaras direitas, e microscopicamente por miocardite focal pouco acentuada; na fase crônica, por cardiomegalia moderada ou acentuada, com hipertrofia e dilatação de câmaras e adelgaçamento da ponta (aneurisma apical), predominantemente do ventrículo esquerdo, e por miocardite focal, com áreas de necrose miocitolítica e degeneração de miocélulas, associadas a infiltrado inflamatório, principalmente composto de linfócitos, e fibrose intersticial. Devido à reprodução de aspectos da doença cardíaca chagásica humana em tempo relativamente curto, à simplicidade, à disponibilidade para múltiplos pesquisadores e ao baixo custo, o modelo representado pelo coelho constitui uma alternativa para estudos dos mecanismos, patologia e tratamento da cardiopatia chagásica.*

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*. Coelho. Cardiopatia chagásica. Doença de Chagas. Modelo experimental.

A doença de Chagas, constitui um dos mais importantes problemas de saúde pública no países latino-americanos<sup>29</sup>. A doença é caracterizada por três fases: aguda, latente e crônica<sup>16 17</sup>. O mais importante envolvimento visceral é o do coração. Na fase aguda, o grau de envolvimento miocárdico varia desde formas leves, assintomáticas ou oligossintomáticas, até formas graves, eventualmente fatais; estas formas graves são infrequentes e constituem apenas 3 - 10% dos casos<sup>17</sup>. Na fase crônica, nos estágios iniciais, o paciente pode ser assintomático ou apresentar sintomas relacionados a distúrbios de ritmo; nos estágios intermediários, as manifestações clínicas persistem ou se intensificam, e um aumento do coração, de grau leve a moderado, pode ser detectado;

nos estágios finais, há acentuado aumento do coração com grave insuficiência cardíaca congestiva, fenômenos tromboembólicos e arritmias graves. A morte repentina representa um perigo constante em qualquer estágio da doença. A fase latente é o período intermediário que separa as fases aguda e crônica, usualmente de longa duração (10 - 20 anos), pouco se conhecendo sobre suas manifestações clínico-patológicas.

A patologia reflete a importância do envolvimento cardíaco na doença de Chagas<sup>2, 13</sup>. Na fase aguda, o coração é globoso e flácido; microscopicamente observam-se focos de necrose miocitolítica e degeneração miocelular com intenso infiltrado inflamatório mononuclear associados a fenômenos exsudativos e parasitismo de miofibras. Na fase crônica, a cardiopatia é polimorfa, com graus variáveis de hipertrofia e dilatação, apresentando ou não aneurisma apical; microscopicamente observa-se um infiltrado inflamatório focal ou difuso, focos de necrose miocitolítica e degeneração de células miocárdicas, fibrose intersticial de grau variável e raras fibras com parasitos intracelulares.

\* Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; \*\* Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Trabalho financiado parcialmente pela FAPESP, CNPq e FIPPEC.

Endereço para correspondência: Dr. Florêncio Figueiredo, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 14100-Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Recebido para publicação em 27/9/84.

Vários mecanismos têm sido considerados como implicados na patogênese da cardiopatia cha-

gásica, tais como os de natureza imunológica<sup>8 20 23 24</sup> hipoxêmica<sup>12 21 28</sup> e neurogênica<sup>13</sup>. Todavia, a patogênese dessa cardiopatia permanece não esclarecida.

No presente trabalho descrevemos a evolução, do ponto de vista anatomopatológico, da cardiopatia experimentalmente induzida em coelhos infectados com *T. cruzi*. Estudos clínicos, patológicos, parasitológicos e imunológicos foram relatados anteriormente<sup>18 24 25</sup>. O presente estudo estende e aprofunda a descrição dos achados patológicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e cinco coelhos *outbred* da raça Nova Zelândia, de ambos os sexos, com 1 - 2 meses de idade, foram inoculados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  formas tripomastigotas/kg de peso corporal da cepa Colômbia de *T. cruzi*<sup>9</sup>, obtidas por punção cardíaca de camundongos em pico de parasitemia. Quinze animais-controle foram injetados com solução salina em vez de cepa Colômbia de *T. cruzi*.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais sob condições ambientais controladas. A parasitemia foi avaliada pelo teste do xenodiagnóstico<sup>10</sup>. Os coelhos foram sangrados periodicamente e os soros estocados a  $-20^\circ \text{C}$  para posterior pesquisa de anticorpos contra *T. cruzi* pelos métodos de imunofluorescência indireta e hemaglutinação passiva<sup>4 5</sup>.

Para a realização do estudo anatomopatológico foram sacrificados cinco animais inoculados e três animais-controle aos 30, 60, 120, 240 e 540 dias após a inoculação. O coração foi rapidamente removido, lavado em solução gelada de NaCl a 0,9% e fixado por inteiro em formalina neutra a 10%. Todos os corações foram seccionados do ápice para a base em duas metades, uma anterior e outra posterior e avaliados macroscopicamente; foram colhidos fragmentos dos átrios e dos ventrículos. Após inclusão em parafina foram obtidas secções de  $6 \mu\text{m}$  de espessura, coradas com hematoxilina-eosina e pelo método tricrômico de Cason e examinadas ao microscópio óptico. Para o estudo ultra-estrutural, pequenos fragmentos da base e das proximidades da ponta de quatro corações de coelhos infectados (dois com 120 e dois com 240 dias) e de dois respectivos controles, foram fixados em aldeído glutárico a 2,5% em tampão de fosfato (pH 7,3) por duas horas, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão de fosfato, desidratados em concentrações ascendentes de acetona e incluídos em resina de epóxi (Araldite). Secções ultrafinas foram obtidas em ultramicrotomo Sorvall MT-5000, duplamente coradas com citrato de chumbo e acetato de uranila e examinadas em microscópio eletrônico Zeiss em 109 a 80 kV.

## RESULTADOS

Todos os animais inoculados com *T. cruzi* apresentaram níveis de parasitemia detectados pelo xenodiagnóstico (Fig. 1). No 15º dia pós-infecção a parasitemia atingiu um pico, quando 100% dos barbeiros examinados estavam positivos. Posteriormente o percentual de triatomíneos infectados decresceu paulatinamente, atingindo níveis intermediários que oscilaram entre 30 e 40% de positividade nos 30º e 40º dias após a inoculação; após 60 dias apenas 10% dos barbeiros estavam positivos, enquanto com 90 ou mais dias todos os animais tiveram xenodiagnósticos negativos.

O percentual de coelhos infectados com anticorpos humorais específicos contra *T. cruzi* é mostrado na Figura 2. No 10º dia após a inoculação,

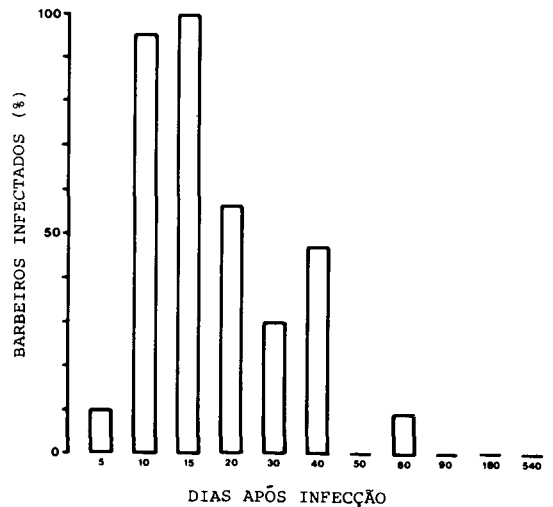


Figura 1 - Parasitemia demonstrada pelo xenodiagnóstico em coelhos inoculados com a cepa Colômbia de *T. cruzi* (parasitemia = número de *D. maximus* infectados com *T. cruzi*/número total de insetos usados  $\times 100$ ).

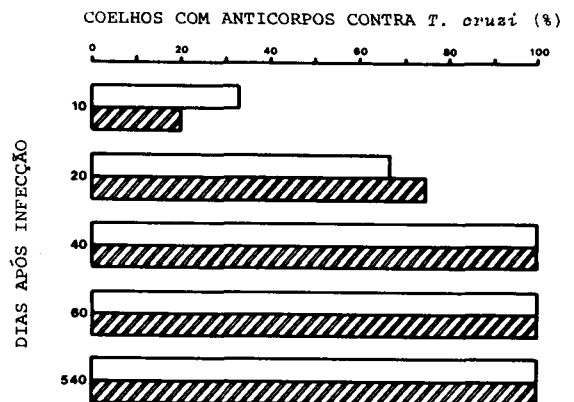


Figura 2 - Pesquisa de anticorpos circulantes contra *T. cruzi* no soro de coelhos inoculados, pelas técnicas de imunofluorescência indireta ( $\square$ ) e de hemaglutinação passiva ( $\text{▨}$ ).

33,3% e 20% dos animais apresentaram títulos de anticorpos detectados pelas técnicas de imunofluorescência e hemaglutinação, respectivamente. No 20º dia, essas taxas se elevaram para 66,6% e 75%, respectivamente. Depois de 40 dias pós-infecção todos os animais apresentaram anticorpos detectados por ambas as técnicas.

Até 60 dias após a inoculação de *T. cruzi* os corações de quatro coelhos mostravam-se idênticos aos dos controles; os demais apresentavam-se flácidos, com miocárdio congesto e dilatação de câmaras direitas. Alterações macroscópicas importantes foram

observadas a partir de 120º dia após a inoculação. Dos 15 corações examinados de animais com 120 ou mais dias de infecção, oito (53,3%) apresentavam cardiomegalia com graus variados de dilatação e hipertrofia das câmaras (Figs. 3 e 4) e abaulamento do cone da pulmonar. Adelgaçamento da ponta do ventrículo esquerdo (aneurisma apical) foi detectado em quatro (26,6%) corações (Fig. 4), um dos quais também apresentava adelgaçamento da ponta do ventrículo direito. Outro achado freqüente foi a fibrose miocárdica, observada em oito (53,3%) corações, de intensidade proporcional ao tempo de infecção. (Figs. 3 e 4)



Figura 3 – Coração de coelho com 540 dias de infecção pelo *T. cruzi*, apresentando hipertrofia e dilatação de câmaras: 2,2x.



Figura 4 – Coração de coelho com 240 dias de infecção pelo *T. cruzi*, apresentando dilatação de câmaras, hipertrofia e aneurisma apical (ventrículo esquerdo). 2,2x.

O exame histopatológico do miocárdio de coelhos infectados revelou alterações focais cuja intensidade era proporcional ao tempo de infecção. Nos animais sacrificados com 30 dias observou-se um quadro de miocardite focal discreta, com dissociação edematosa de miofibras, focos de necrose miocitolítica e degeneração e infiltrado mononuclear. Após 60 dias, a miocardite era mais intensa, com áreas disseminadas de necrose miocitolítica e alterações degenerativas de miocélulas; miofibras atroficas ao lado de outras

hipertrofiadas puderam ser vistas, além de um infiltrado celular mononuclear intenso. As Figuras 5 e 6 mostram o miocárdio de coelhos com 120 dias de infecção. A fibrose intersticial variava desde o padrão perivascular e discreto até o comprometimento de extensas áreas do miocárdio (Figs. 7 e 8).

As alterações ultra-estruturais do miocárdio de animais com 120 e 240 dias de infecção variavam de

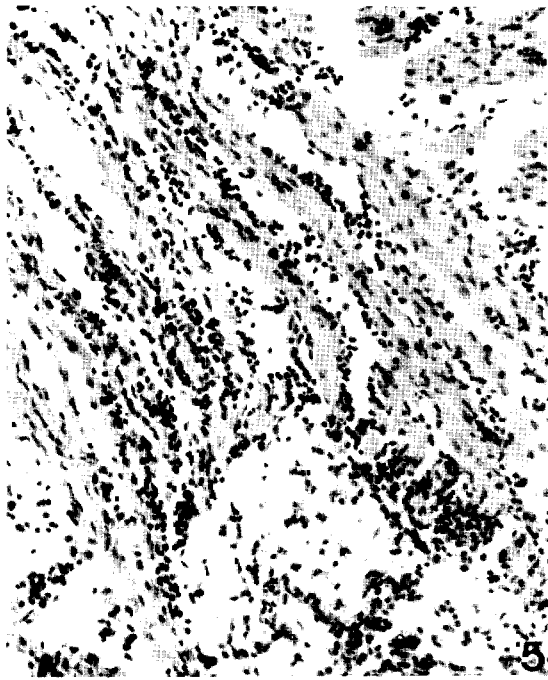


Figura 5 – Miocárdio de coelho com 120 dias de infecção pelo *T. cruzi*. Necrose miocitolítica e degeneração miocelular. Resposta inflamatória mononuclear. Dissociação de miofibras. H.E. 170x.

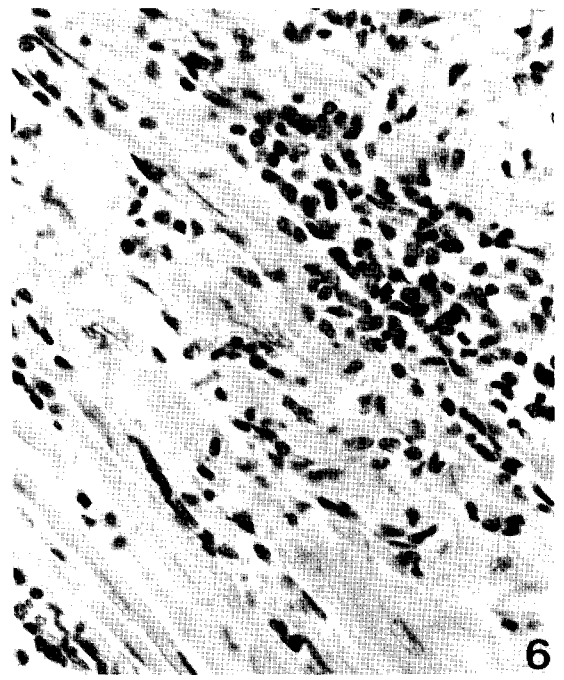


Figura 6 – Miocárdio de coelho com 120 dias de infecção. Foco de necrose miocitolítica e degeneração miocelular. Infiltrado intersticial mononuclear. H.E. 430x.

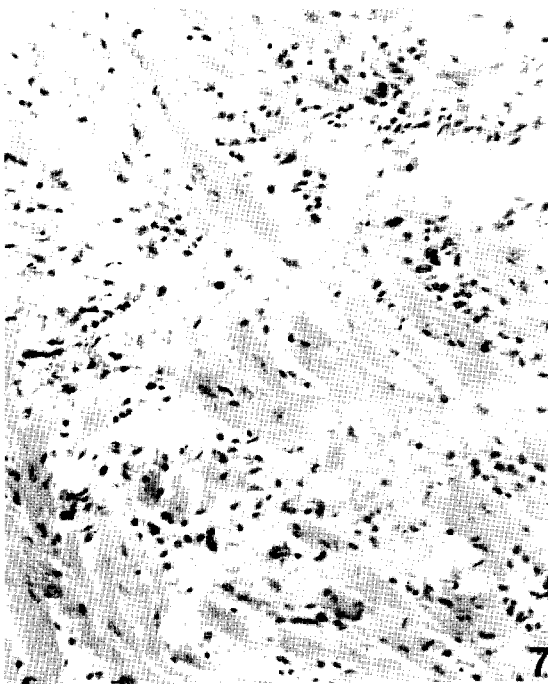


Figura 7 – Miocárdio de coelho com 240 dias de infecção. Fibrose intersticial difusa acentuada associada a infiltrado mononuclear. H.E. 170x.



Figura 8 – Miocárdio de coelho com 240 dias de infecção. Fibrose intersticial. Infiltrado mononuclear. Lise e degeneração de miofibras. Tricrômico de Cason, 170x.

uma área para outra e de um aspecto normal à completa dissociação das fibras miocárdicas. Em áreas discretas e moderadamente lesadas as miofibras mostravam-se desorganizadas, com focos de lise. Além disso havia edema intermiofibrilar, com formação de vacúolos intracitoplasmáticos. As mitocôndrias mostravam-se tumefeitas, com desorganização e ruptura de cristas e diminuição da densidade da matriz mitocondrial. Um aparente aumento do número

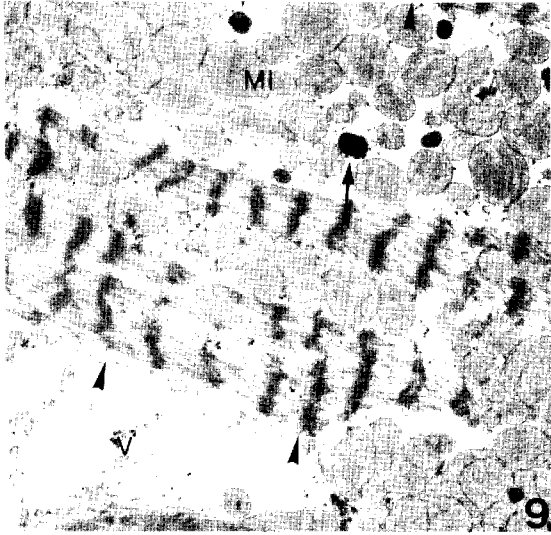


Figura 9 – Eletromicrografia (EM): Miofibrilas hipercontraídas com ruptura e perda de miofilamentos (pontas de flechas). Edema intracelular e vacuolização (V). Presença de número aumentado de corpúsculos eletrodensos (peroxissomas?) (flechas). Mitocôndriose (MI). 7000x.

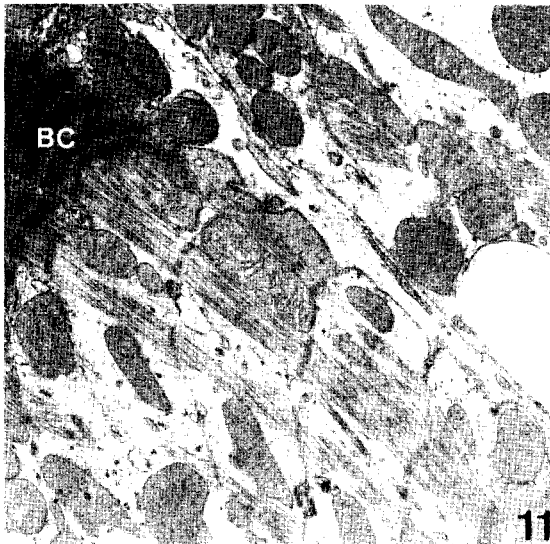


Figura 11 – EM: Edema intermiofibrilar (\*). Lise de miofilamentos. Bandas de contração (BC). 10560x.

de mitocôndrias (mitocôndriose) foi também evidenciado. Frequentemente as miocélulas estavam hipercontraídas, com formação de bandas anômalas de contração. O espaço intersticial estava ampliado devido a fluido de edema e infiltração celular por fibroblastos ativados com deposição de fibras colágenas e discreto infiltrado constituído predominantemente por linfócitos (Fig. 9 – 16).

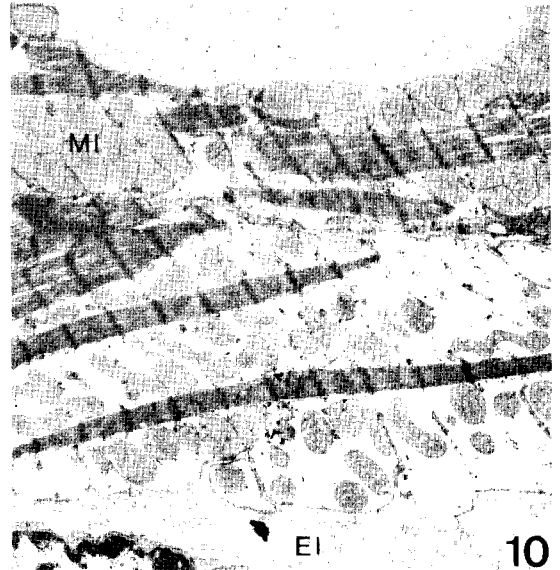


Figura 10 – EM: Edema intracelular. Vacúolo intracitoplasmático (V). Mitocôndriose (MI). EI, espaço intersticial. 5200x.

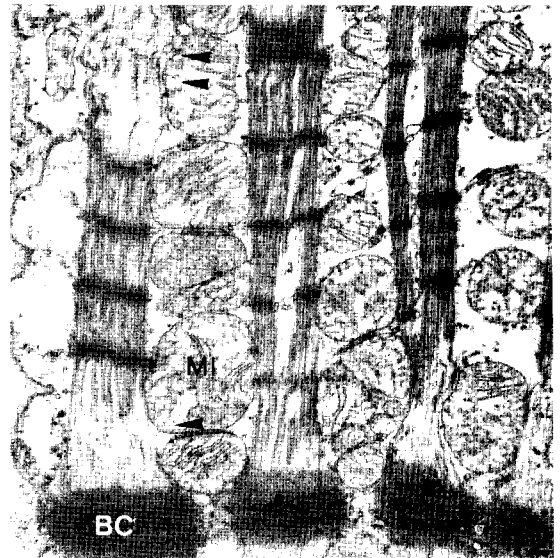


Figura 12 – EM: Tumeção mitocondrial (MI), com aclaramento de matriz e ruptura de cristas. Bandas de contração (BC). Ruptura de miofilamentos (pontas de flechas). Edema intermiofibrilar. 10560x.

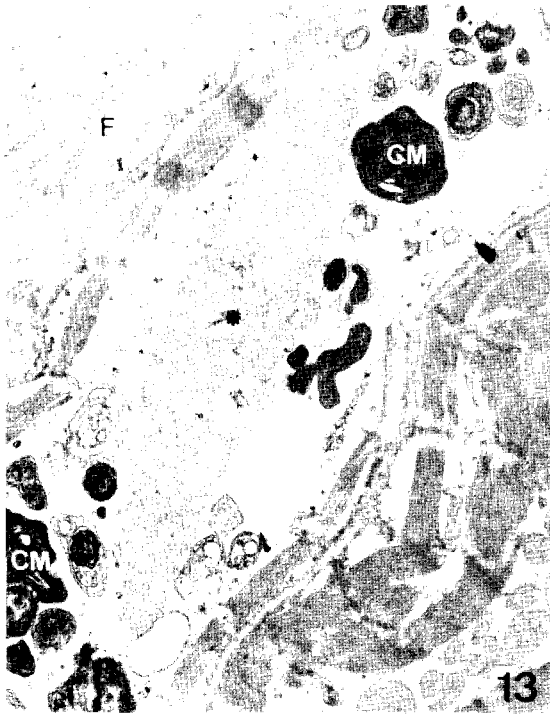


Figura 13 - EM: Miofibrila atrófica com lise de miofilamentos (\*) e grande número de corpos mielínicos (CM). Fibrose intersticial (F). 10560x.

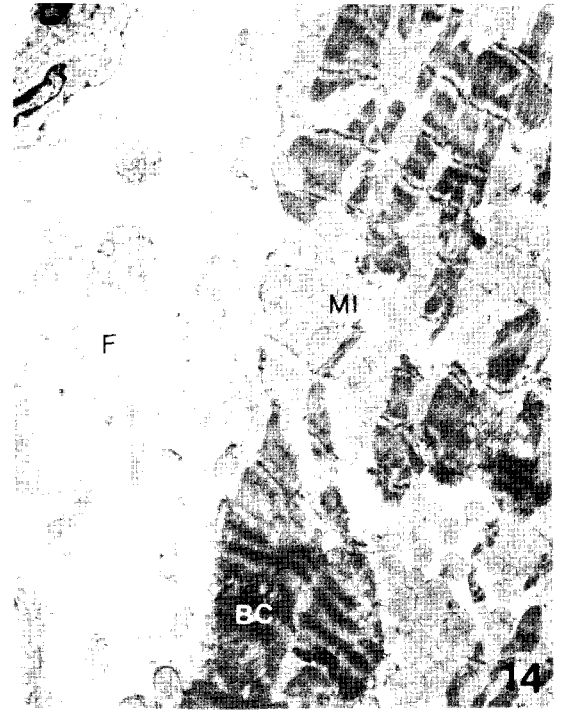


Figura 14 - EM: Fibrose intersticial (F). Mitocondriose (MI). Bandas de contração (BC). 5200x.

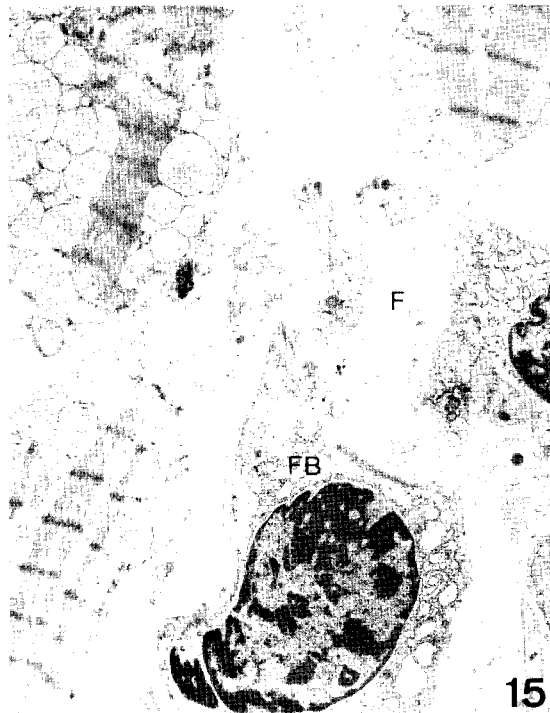


Figura 15 - EM: Fibrose intersticial (F). Fibroblastos ativados (FB). 5200x.

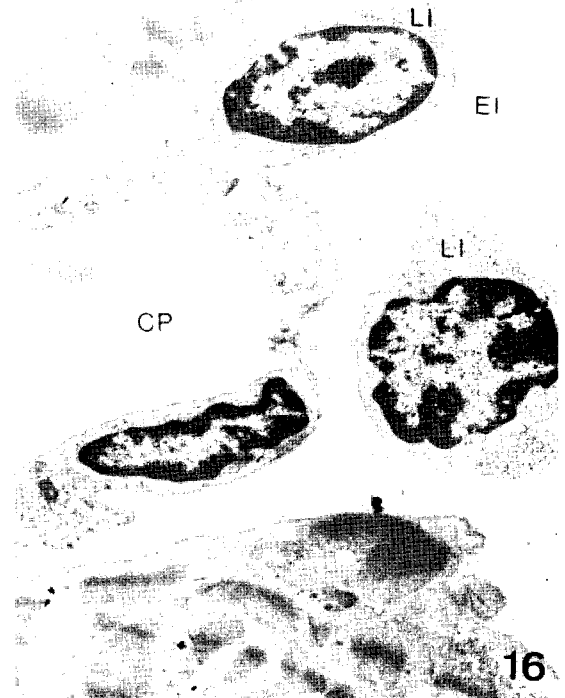


Figura 16 - EM: Alargamento do espaço intersticial (EI), onde se nota microfibrilas e células mononucleares (linfócitos) (LI). CP, capilar. 7000x.

## DISCUSSÃO

Na fase aguda da doença de Chagas no homem os parasitos podem ser detectados no sangue periférico através de métodos diretos e/ou do xenodiagnóstico. Posteriormente surgem os anticorpos específicos contra *T. cruzi*. Do ponto de vista patológico o coração pode estar discretamente aumentado de tamanho, com aumento de peso e dilatação de câmaras. Microscopicamente observa-se uma miocardite caracterizada por focos de necrose miocitolítica e de degeneração de miofibras, infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, discreta fibrose intersticial e fibras miocárdicas contendo pseudocistos parasitários. Na fase crônica os parasitos são dificilmente encontrados no sangue periférico, enquanto as provas sorológicas demonstram elevados títulos de anticorpos humorais específicos. Usualmente os corações apresentam-se com forma globular, hipertrofiados e com dilatação de todas as câmaras. Outras vezes apresentam-se normais na forma e no tamanho. Abaulamento do cone da pulmonar é quase sempre evidente. A lesão mais característica é o adelgaçamento e a protusão da região apical, particularmente do ventrículo esquerdo, encontrada em cerca de 50 – 60% dos casos, usualmente denominada de aneurisma de ponta. Microscopicamente observam-se áreas focais de necrose miocitolítica e degeneração, com resposta inflamatória composta de células mononucleares com coincidente fibrose intersticial e ocasionais miofibras contendo pseudocistos parasitários. Lesões do sistema nervoso autônomo e do sistema de condução têm também sido descritas. As alterações patológicas que ocorrem na fase latente são muito pouco conhecidas<sup>2 6 13</sup>.

Os nossos resultados mostram que o coelho é um animal susceptível à infecção experimental com *T. cruzi*, corroborando resultados anteriores<sup>18 24 25</sup>. Na fase aguda apresentam baixos níveis de parasitemia, demonstráveis através do xenodiagnóstico. A baixa parasitemia está de acordo com o relato na doença humana, na qual, em muitos casos, mesmo na fase aguda, o exame direto demonstra poucos parasitos<sup>1 7 14</sup>, sendo muitas vezes necessária a utilização de métodos de enriquecimento ou mesmo do xenodiagnóstico para a confirmação parasitológica<sup>26</sup>. Além disso, observamos no curso da infecção o aparecimento de anticorpos humorais específicos contra *T. cruzi*. Esses dados estão de acordo com a literatura, muito semelhantes aos verificados na doença humana, caracterizada por altos níveis de anticorpos, predominantemente da classe IgM na fase aguda e da classe IgG na fase crônica<sup>6</sup>.

Com relação à anatomia patológica do coração nossos resultados demonstram que coelhos experi-

mentalmente infectados desenvolvem muitos aspectos da doença cardíaca no homem. Na fase inicial as alterações cardíacas são caracterizadas macroscopicamente por cardiomegalia discreta, com dilatação de câmaras direitas, e microscopicamente por miocardite focal pouco acentuada. Na fase crônica a síndrome cardíaca é caracterizada macroscopicamente por cardiomegalia moderada ou acentuada com hipertrofia e dilatação de câmaras, e adelgaçamento da ponta (aneurisma apical), predominantemente do ventrículo esquerdo; microscopicamente, por miocardite focal intensa, com áreas de necrose miocitolítica e degeneração de miocélulas, miofibras atroficas ao lado de outras hipertróficas, associadas a um fenômeno inflamatório, predominantemente composto de linfócitos, e fibrose intersticial. Observações anteriores<sup>18 25</sup> mostraram, em coelhos cronicamente infectados com *T. cruzi*, alterações eletrocardiográficas e anatomopatológicas muito semelhantes às descritas no homem e às do presente estudo. Os nossos achados ultra-estruturais são muito semelhantes àqueles observados na cardiopatia chagásica crônica humana<sup>15 22</sup>. Todavia, essas alterações morfológicas não são específicas, desde que alterações idênticas têm sido descritas em várias formas de doença cardíaca, tais como cardiomiopatia congestiva e valvulopatia aórtica<sup>15</sup>.

O emprego de modelos experimentais animais tem sido importante para o estudo dos possíveis mecanismos envolvidos na patogênese da cardiopatia chagásica<sup>2</sup>. Mecanismos imunológicos têm sido implicados<sup>8 20 23 24</sup>. Lesão de neurônios autonômicos sido postulada como um mecanismo patogênico alternativo<sup>13</sup>. A participação de mecanismos auto-*imunes* se fundamenta na miocardite caracterizada por um infiltrado de células mononucleares, observada nas fases aguda e crônica<sup>23</sup>. A reação inflamatória se assemelha às lesões de outras doenças de hipersensibilidade. O mecanismo de lise tecidual seria dependente da sensibilização a antígenos parasitários<sup>19 20</sup> ou por reatividade cruzada entre o parasito e componentes teciduais<sup>23 24 27</sup> e mediado por células imunocompetentes capazes de induzir células efetoras de lesão. O estudo microscópico do miocárdio de coelhos infectados mostrou um infiltrado inflamatório mononuclear associado a lesões de miofibras, tanto na fase aguda como na fase crônica. Também caracterizamos por meio de microscopia óptica e eletrônica alterações miocelulares muito semelhantes à necrose não-coronarigênica observada em um grande número de doenças cardíacas no homem. Uma forma semelhante de lesão focal tem sido observada experimentalmente<sup>11</sup> e clinicamente<sup>3</sup> na isquemia transitória do miocárdio. Esses fatos, associados ao caráter focal da lesão miocárdica, constituem evidências indiretas da participa-



ção da microcirculação na gênese das alterações miocárdicas no presente modelo. Recentemente, tem sido sugerido que a microcirculação poderia estar implicada na patogênese da cardiopatia chagásica<sup>21</sup>. Desse modo, o substrato morfológico da cardiopatia experimental induzida em coelhos inoculados com a cepa Colômbia de *T. cruzi* sugere que no seu determinismo poderiam estar envolvidos mecanismos imunológicos e isquêmicos.

Em resumo, coelhos jovens experimentalmente infectados com *T. cruzi* desenvolvem alterações patológicas do coração, macro e microscópicas, além de características parasitológicas e imunológicas, muito semelhantes às observadas na doença de Chagas humana, tanto na fase aguda como na fase crônica. Desse modo, devido à reprodução de aspectos fundamentais da doença cardíaca em um tempo relativamente curto, à simplicidade, à disponibilidade para múltiplos pesquisadores e ao baixo custo, esse modelo parece ser adequado para estudos sobre mecanismos, patologia e tratamento da cardiopatia chagásica.

#### SUMMARY

*Male and female outbred young rabbits (1 - 2 months of age) inoculated with trypomastigote forms of the Colombia strain of T. cruzi have been shown to develop cardiac pathologic changes, besides parasitological and immunological features, very similar to those observed in both acute and chronic phases of Chagas' disease in man. In the acute phase the cardiac syndrome is characterized grossly by slight cardiomegaly, with dilatation of the right chambers and microscopically by discrete focal myocarditis: in the chronic phase, by moderate or marked cardiomegaly, with hypertrophy and dilatation of all chambers, and thinning of the ventricular apex (apical aneurysm), particularly of the left ventricle, and striking focal myocarditis, with areas of myocytolytic necrosis and degeneration of myofibers, with concurrent inflammatory response, predominantly composed of lymphocytes, and interstitial fibrosis. The accurate reproduction of the cardiac disease in a relatively short period, the simplicity, availability and long survival of the animal, and the low costs make this animal model suitable for studies on pathology and treatment of chagasic cardiopathy.*

*Key words:* *Trypanosoma cruzi*. *Rabbit*. *Chagasic cardiopathy*. *Chagas' disease*. *Experimental model*.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às Srs<sup>as</sup> Maria M.O. Rossi, Maria Helena L.N. Gomes e aos Srs. Carlos Kipnis e

Ivo Mazucato pela excelente assistência técnica, e à Srt<sup>a</sup> Dina B. Pelizaro pelo trabalho datilográfico.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amato-Neto V. Contribuição ao estudo da forma aguda da doença de Chagas. Tese de livre-docência. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 1958.
2. Andrade Z, Andrade SG. Patologia. In: Brener Z, Andrade Z (ed). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 199-248, 1979.
3. Bulkley BH, Hutchins GM. Myocardial consequences of coronary artery bypass graft surgery: the paradox of necrosis in areas of revascularization, 56: 906-913, 1977.
4. Camargo ME. Fluorescent antibody test for serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 8: 277-234, 1966.
5. Camargo ME, Hoshino S, Siqueira GRV. Hemagglutination with preserved sensitized cells: practical test for routine serologic diagnosis of American trypanosomiasis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 15: 81-85, 1973.
6. Camargo ME, Takeda GKF. Diagnóstico de laboratório. In: Brener Z, Andrade Z (ed) *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 175-198, 1979.
7. Chagas C. Tripanozomíase americana: forma aguda da moléstia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 8: 37-60, 1916.
8. Cossio PM, Laguens RP, Diez C, Szarfman A, Segal A, Araña RM. Chagasic cardiopathy: antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. Circulation 50: 1252-1259, 1974.
9. Federici EE, Abelmann, WH, Neva FA. Chronic progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 13: 272-280, 1964.
10. Figueiredo F. Infecção experimental de coelhos com *Trypanosoma cruzi*: aspectos de parasitologia, imunologia e patologia. Tese de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 1984.
11. Jennings RB, Ganote CE. Structural changes in myocardium during acute ischemia. Circulation Research 35 (Supl. III): 156-172, 1974.
12. Jörg ME. Tripanosomíasis cruzi: anarquía angiopotopográfica por descapilarización mesenquimorreactiva, co-



- factor patogénico de la miocardiopatia crónica. *Prensa Médica Argentina* 61: 94-106, 1974.
13. Köberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. In: Dawes B (ed) *Advances in Parasitology*, vol. 6, Academic Press, London, p. 63-116, 1968.
  14. Mazza S, Benitez C. Segundo caso de forma aguda de enfermedad de Chagas comprobado en Corrientes. *Misión de Estudos de Patología Regional Argentina* 28: 13-22, 1936.
  15. Palacios-Prü E, Carrasco H, Scorza C, Spinoza R. Ultraestructura miocárdica en la enfermedad miocárdica de Chagas. Diagnóstico diferencial con la miocardiopatia dilatada o congestina y con las miocardiopatías arritmicas. *Revista Latino-Americana de Cardiología* 3: 115-137, 1982.
  16. Prata A. Chagas' heart disease. Introduction. *Cardiologia* 52: 79-81, 1968.
  17. Puigbo J. Chagas' heart disease. Clinical aspects. *Cardiologia* 52: 91-96, 1968.
  18. Ramirez LE, Vargas M, Dias JCP, Brener Z. Histopathological and electrocardiographic studies in rabbits experimentally inoculated with *Trypanosoma cruzi*. In: *Resumos da X Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu*; p. 334, 1983.
  19. Ribeiro-dos-Santos R, Rassi A, Köberle F. Chagas' disease. *Antibiotics and Chemotherapeutics* 30: 115-134, 1981.
  20. Ribeiro-dos-Santos R, Rossi MA. Imunopatologia da cardiopatia chagásica. In: *Cançado JR, Chuster M (ed) Cardiopatia Chagásica, 1985 (no prelo)*.
  21. Rossi MA, Gonçalves S, Santos RR. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice: the potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. *American Journal of Pathology* 114: 209-216, 1984.
  22. Tafuri WL, Maria TA, Lopes ER, Chapadeiro ER. Microscopia eletrônica do miocárdio na tripanosomíase cruzi humana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 15: 347-370, 1973.
  23. Teixeira ARL. Patogênica da doença de Chagas. *Jornal Brasileiro de Medicina* 38: 23-33, 1980.
  24. Teixeira ARL, Teixeira L, Santos-Buch CA. The immunology of experimental Chagas' disease. IV. The production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. *American Journal of Pathology* 80: 163-177, 1975.
  25. Teixeira ARL, Figueiredo F, Rezende-Filho J, Macedo V. Chagas' disease: a clinical, parasitological, immunological, and pathological study in rabbits. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32: 258-272, 1983.
  26. Teixeira MGLC. Doença de Chagas. Estudo da forma aguda inaparente. Tese de mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1977.
  27. Teixeira ML, Rezende Filho J, Figueiredo F, Teixeira ARL. Chagas' disease: selective affinity and cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi* - immune lymphocytes to parasympathetic ganglion cells. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 75: 33-45, 1980.
  28. Torres CM. Miocitólise e fibrose do miocárdio na doença de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 58: 161-182, 1960.
  29. World Health Organization Technical Report Series 697. Chagas' disease. In: *Cardiomyopathies. Report of a WHO Expert Committee*. World Health Organization, Geneva, p. 50-55, 1984.