

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Programa de Pós-Graduação *stricto sensu*
Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

*AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E DA ENZIMA
ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA – iNOS – NO MÚSCULO
CARDÍACO DE MACACOS RHESUS (Macaca mulatta)
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS PELO Trypanosoma
cruzi: associação entre a evolução clínica e a extensão das lesões
cardíacas.*

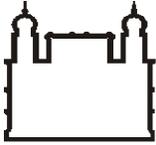
por

Cristiane Ramos Garcia

*Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em
Ciências na área de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.*

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Glória Bonecini-Almeida

Rio de Janeiro, 20 de Dezembro de 2006.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



I P E C
Instituto de Pesquisa Clínica
EVANDRO CHAGAS

Programa de Pós-Graduação *stricto sensu*
Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

Esta dissertação, intitulada

*“AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E DA ENZIMA
ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA – iNOS – NO MÚSCULO
CARDÍACO DE MACACOS RHESUS (Macaca mulatta)
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS PELO Trypanosoma
cruzi: associação entre a evolução clínica e a extensão das lesões
cardíacas.”*

Apresentada por

Cristiane Ramos Garcia

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a Andréa Henriques-Pons

Prof.^o Dr.^o Luiz Roberto Sardinha

Prof.^a Dr.^a Joseli Lannes Vieira – Presidente

Dissertação defendida e aprovada em 20 de Dezembro de 2006.

G216 Garcia, Cristiane Ramos

Avaliação da expressão de citocinas e da enzima óxido nítrico sintase induzida – iNOS – no músculo cardíaco de macacos rhesus (*macaca mulatta*) experimentalmente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* : associação entre a evolução clínica e a extensão das lesões cardíacas / Cristiane Ramos Garcia. – Rio de Janeiro, 2007.
xviii, 86 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, Pesquisas Clínicas em Doenças Infecciosas, 2006.
Bibliografia: f. 70-86.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. *Macaca mulatta*. 3. Tecido cardíaco.
4. Evolução clínica. 5. iNOS. 6. Citocinas. I. Título.

CDD: 616.9364

Dedico esta dissertação à minha família:

Ao meu Pai, Francisco Garcia Martins: sua história me encoraja, seu trabalho me inspira. É o meu exemplo, meu ídolo, o homem mais honrado que eu conheci na vida.

À minha Mãe, Denize Ana Ramos Garcia: esposa dedicada, mãe excepcional e mulher de fibra. Seu amor incondicional que afaga meu desespero, que alegra o meu sorriso, que aumenta a minha fé, é a energia que me sustenta e o anjo que me protege.

À minha irmã Alessandra Ramos Garcia: minha menina-mulher que tem dentro de si uma sabedoria singular, uma responsabilidade invejável e um coração de ouro. Quero poder lhe ser a amiga mais fiel e lhe proteger por todo o sempre. Você é uma das razões que me faz lutar por uma vida melhor a cada dia.

Estaremos sempre unidos através do nosso amor onde quer que estejamos!

Salutation to the dawn

*Look to this day!
For it is life, the very life of life.
In its brief course
Lie all the verities and realities of your
existence:
The bliss of growth
The glory of action
The splendor of beauty,
For yesterday is but a dream
And tomorrow is only a vision,
But today well-lived makes every
yesterday a dream of happiness
And every tomorrow, a vision of hope.
Look well therefore to this day!
Such is the salutation to the dawn.*

Kalidasa

Existem três espaços vitais no cosmos.

O mar, onde o peixe não fala

A Terra, onde os animais gritam

O céu, onde os pássaros cantam

O homem participa destes três espaços

Das profundezas do mar

Do peso da terra

Da imensidão do céu

Ele possui o direito de ficar calado, de
gritar e de cantar.

Mas ao homem sem superação, é dada
apenas a capacidade de gritar.

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Dra. Maria da Glória Bonecini Almeida pelos conselhos e pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional e pessoal: a você, o meu muito obrigada;

Aos colaboradores da UERJ: Profº Dr. Carlos Alberto Mandarin de Lacerda, Profº Dr. Rogério Mussel, Leonardo e Daniela do Laboratório de Morfologia pelo importante auxílio no desenvolvimento das análises estereológicas;

Ao Dr. Marcelo Pelajo do Laboratório de Patologia – IOC, por toda a atenção dispensada no preparo das lâminas para as análises histopatológicas;

A todos do Laboratório de Produção e Tratamento de Imagens do IOC, especialmente ao Rodrigo Mexas e Genilton José Vieira: obrigada pelo carinho, reconhecimento e mais ainda, pela competência, profissionalismo e dedicação expressos em cada foto. Obrigada pelas dicas e pelo aprendizado que só enriqueceram este trabalho.

A Dra. Janice Mary Chicarino de Oliveira Coelho do Laboratório de Anatomia Patológica – IPEC pelos ensinamentos tão preciosos e por toda a sua paciência nas análises histopatológicas e especialmente aos técnicos Sr. Antonio e Sr. Marcos pela confecção das lâminas para imunohistoquímica e histopatologia;

À querida Ana Teresa Gomes Fernandes pelas horas dispensadas para a realização da imunohistoquímica, por todo o seu empenho e dedicação para que este trabalho fosse concretizado. Que Deus lhe conceda muitas bênçãos e sucesso em sua vida. Muito obrigada.

À querida Ingebourg Georg por demonstrar tanta paciência e por sempre ter uma palavra amiga nestes dois anos de convivência. Obrigada pelo carinho e pelos conselhos muito valiosos.

Ao Dr. Cristiano Carvalho pela atenção e paciência dispensadas em uma das horas mais críticas na finalização deste trabalho.

À Dra Liane Carvalho pelos sábios ensinamentos trocados, pela atenção e pelo carinho dispensado. Namaste!

Ao Serviço de Imunologia: Ana Cristina Santiago Leandro, Andréia Lamoglia, Carla Blal, Carlos Otávio, Dra Cynthia Horn, Dyego Carletti, Fernanda Silva, Larissa Catharina, João Paulo Sobral, Leonardo de Oliveira, Leonardo Gatto, Marcelo Leandro, Márcia Andrade (e família), Marcio Barradas, Maria Helena Oliveira, Maristela Lima, Millena Rosalba, Monique Lima, Neiva Grativol, Priscila Novaes, Roberta Coelho, Dna. Silvia Silva, Suely Carvalho e Tatiana Carvalho, pelo auxílio direto ou indireto neste trabalho. Muito obrigada a todos!

À minha querida irmã carioca Renata Travassos, minhas sobrinhas Isabel e Gabriela pelo incentivo, pelo trabalho e por toda a ajuda que vocês me concedem diariamente. Que Papai do Céu continue sempre lhes abençoando;

Ao Glauco Figueiredo dos Santos por compartilhar os planos em continuar meus estudos em doença de Chagas, por toda sua dedicação, pelos amigos compartilhados e também à sua mãe Joselina e sua irmã Glaucia, pela torcida e apoio nos meus primeiros passos aqui no Rio: no final, tudo valeu muito à pena. Muito obrigada a todos;

À minha querida Ana Carolina Eiras (Hana Akif) por ser capaz de retirar risos contidos e por substituir o pânico em esperança. Muito obrigada por existir em minha vida e agregar tantos benefícios;

Aos meus amados amigos de São Paulo: Dra. Fernanda Nunes, Dra. Ana Luiza Carderari (e a todos os amigos da Mondial Assistance, em especial ao Lucas Savordelli e ao Euclides Lanzarin), “Speed” Nelson (meu anjo-amigo autenticamente virginiano) e André Chaves

pelo encorajamento e pelos conselhos para que eu seguisse com os planos de me mudar para o Rio: a saudade é imensa!

Ao querido Anderson Rocha Dias, por ter sido um de meus alicerces aqui no Rio, por me aturar o tempo todo e por ter sido um parceiro incondicional nas horas boas ou ruins: que os anjos te protejam sempre.

A todos os animais deste experimento, que por quase suas vidas todas serviram como instrumento para o aperfeiçoamento dos conhecimentos humanos: a vocês o meu mais profundo agradecimento e respeito.

Aos meus pais Francisco e Denize, à minha irmã Alessandra e meu cunhado Eduardo: perdoem-me pela ausência, pelos momentos de angústia e de torcida, compartilhados tão de longe e por aprenderem a sonhar os meus sonhos: sem o apoio e dedicação de vocês, que são a minha vida, nada disso estaria acontecendo. “E não há nada pra comparar, para poder lhes explicar. Como é grande o meu amor por vocês”.

E mais uma vez e sempre a Deus: muito obrigada pela renovação de fé, pela direção dos meus passos e pensamentos que são a luz no meu caminho. Muito obrigada pelos novos amigos, pelas novas experiências, pelas alegrias e tristezas, por permitir o meu aprendizado e pela saudade que somente fortaleceu os laços com aqueles que estão distantes de mim. Pai: abençoe cada animal e a todas as pessoas envolvidas na minha vida!

RESUMO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma doença de caráter multifatorial que envolve basicamente a persistência do parasita, o processo inflamatório e a fibrose tecidual. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a presença tecidual de citocinas pró e anti-inflamatórias e da expressão da iNOS através da imunohistoquímica e associar os resultados com as análises dos perfis clínicos desenvolvidos por nossa coorte de macacos rhesus em 25 anos de infecção experimental, além das análises histopatológicas e morfométricas. A avaliação clínica foi realizada através do levantamento dos dados dos exames radiográficos, eletrocardiográficos e ecocardiográficos realizados neste período. Para categorizar os animais, adotamos os parâmetros de classificação clínica indicados pelo Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Todos os animais apresentaram IgG específica para *T. cruzi*, com exceção do animal 99 que acreditamos ter apresentado cura espontânea. Foi possível verificar uma dissociação entre a presença do processo inflamatório, de caráter multifocal com predominância de células mononucleares e as alterações cardíacas na coorte avaliada. A análise histopatológica revelou uma hipertrofia miocárdica de caráter multifocal e degeneração vacuolar em todos os animais infectados sob variados graus de acometimento com exceção do animal 99. Somente o animal 95 apresentou foco de necrose de liquefação em átrio esquerdo, desprovido de atividade inflamatória local. Nenhum elemento parasitário típico foi encontrado nas amostras cardíacas avaliadas. O padrão de distribuição da fibrose foi avaliado através da coloração de Tricomio de Masson e foi caracterizada como sendo multifocal nos ventrículos e difuso no átrio esquerdo dos animais infectados. Evidenciamos um aumento significativo da densidade de volume dos vasos em ventrículo direito dos animais infectados em relação aos animais controles sadios ($3,7 \pm 0,1\%$; $1,6 \pm 0,5\%$, $p=0,05$). A avaliação da presença de citocinas e da iNOS em ventrículo esquerdo mostrou uma forte tendência à marcação de células em meio a infiltrados inflamatórios e em regiões perivasculares dos animais infectados avaliados. Concluimos que este modelo é satisfatório para o estudo clínico da doença de Chagas aguda e crônica.

ABSTRACT

Chagas' disease or American trypanosomiasis, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* is a multifactorial disease that involves basically parasite persistence, inflammatory process and fibrosis. The aim of this work was to evaluate the tissue presence of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and the iNOS expression by immunohistochemistry analysis and associate the results with the clinical follow up presented by our cohort of rhesus monkeys in 25 years of experimental infection, and also the histopathological and morphometrical analysis. The clinical evaluation was performed analyzing the features found in the X-ray, electrocardiogram and echocardiogram exams in the period of infection. For the clinical characterization, we adopted the Clinical Classification proposed by the Brazilian Consensus on Chagas Disease. All the subjects presented specific anti- *T. cruzi* IgG, except animal 99, which we believe to develop a spontaneous cure. Microscopically, the findings suggested a multifocal hypertrophy and vacuolar degeneration in all infected subjects. The inflammatory process was composed mainly by mononuclear cells in variable degrees of damage. It was possible to verify a dissociation between the presence of inflammation and the cardiac alterations, however the presence of iNOS and IFN γ was proportional to the inflammatory damage found in the studied slices. The distribution of fibrosis was characterized by a diffuse process in the atrium and multifocal in ventricles of the infected animals. A significant increase of the vascular density of volume in right ventricles was found in the infected animals in relation with the healthy control ones ($3,7 \pm 0,1\%$; $1,6 \pm 0,5\%$, $p=0,05$). The evaluation of the presence of cytokines and iNOS in left ventricle showed a strong tendency of marked cells in inflammatory infiltrates and in perivascular regions of the infected animals. We concluded our present work indicating that the model is satisfactory for clinical studies of acute and chronic Chagas disease.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADC: Arginina descarboxilase
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP: Adenosina Trifosfato
AUI: “Cortes” aleatórios uniformemente isotrópicos
BAVG-1: Bloqueio Átrio-Ventricular Grau I
BRE: Bloqueio de ramo esquerdo do feixe de His
BVQRS: Baixa voltagem de QRS
CD: *Cluster of Differentiation*
CMSP: Células Mononucleares do Sangue Periférico
CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
d. p. i. : Dias pós-infecção
ECG: Eletrocardiograma
ECO: Ecocardiograma
E.I.E: Ensaio Imunoenzimático
e-NOS: Óxido Nítrico Sintase endotelial
HCM: Hemoglobina Corpuscular Média
HE: Hematoxilina e Eosina
HIV: Vírus da imunodeficiência humana
HLA: Antígeno leucocitário humano
ICT: Índice Córdio-Torácico
IFI: Imunofluorescência Indireta
IFN γ : Interferon gama
IL- Interleucina
i-NOS: Óxido Nítrico Sintase induzida
IgM: Imunoglobulina do tipo M
LPS: Lipopolissacáride
MAb purif.: Anticorpo monoclonal purificado
MDP: muramil dipeptídeo
MHC: Complexo de histocompatibilidade principal

MIP-1 α : Quimiocina CCL3 (da subfamília CC ou β)
NK: *Natural Killer*: (células) matadoras naturais
n-NOS: Óxido Nítrico Sintase neuronal
NO: óxido nítrico
NOHA: N^G-hidroxi-L-arginina
NOS: Óxido Nítrico Sintase
pAb: Anticorpo policlonal
PBS: Solução salina tamponada com fosfato
PCR: Reação em cadeia da polimerase
P.i. : Pós infecção
RANTES: Quimiocina CCL5 (da subfamília CC ou β)
RIN: Reativos Intermediários de Nitrogênio
RNA: Ácido desoxirribonucléico
RVA: Repolarização ventricular anormal
RX – Raio X
SOD: Superóxido desmutase
TBS: Tris-Buffer Saline
TNF α : Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1: Molécula de adesão celular
VCM: Volume Corpuscular Médio
WHO: Organização Mundial de Saúde

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Acompanhamento da infecção experimental pelo *Trypanosoma. cruzi* de longa duração em macacos rhesus (*Macaca mulata*): relação dos animais de acordo com a idade, peso corpóreo, inóculo e período de infecção.

Tabela 2: Acompanhamento da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em macacos rhesus (*Macaca mulata*) – Parasitemia direta (mm³ de sangue)

Tabela 3: Acompanhamento da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* de longa duração em macacos rhesus (*Macaca mulata*): Hemocultura e Xenodiagnóstico.

Tabela 4: Acompanhamento da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* de longa duração em macacos rhesus (*Macaca mulata*): Alterações eletrocardiográficas, radiológicas e ecocardiográficas

Tabela 5: Anticorpos primários e secundários utilizados para a reação de imunohistoquímica

Tabela 6: Avaliação estereológica do tecido cardíaco de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) na fase crônica tardia da Doença de Chagas: Densidade de volume de cardiomiócitos, tecido conjuntivo e vasos, comprimento dos vasos e área de cardiomiócitos

Tabela 7: Análise da presença de células inflamatórias no tecido cardíaco de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) na fase crônica tardia da Doença de Chagas experimental: número de células inflamatórias por campo histológico, distribuídas nos compartimentos cardíacos.

Tabela 8: Avaliação histopatológica do tecido cardíaco de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) na fase crônica tardia da Doença de Chagas: Porcentagem de fibrose distribuída nos compartimentos cardíacos dos animais infectados e controles.

Tabela 9: Avaliação da expressão da iNOS e citocinas em ventrículo esquerdo de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) na fase crônica tardia da doença de Chagas.

Tabela 10: Classificação clínica e histopatológica através do sistema de score

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo Evolutivo da doença de Chagas.

Figura 2 - Vias metabólicas da L-arginina nas células de mamíferos e no *T. cruzi*

Figura 3 - Infiltrado inflamatório – Corte histológico do ventrículo esquerdo do animal 64 infectado experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi* demonstrado pela coloração HE (10X). Detalhe em maior aumento (40X).

Figura 4 - Infiltrado inflamatório – Corte histológico do ventrículo esquerdo do animal 103 infectado experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi* demonstrado pela coloração HE (10X): epicardite multifocal permeando adipócitos

Figura 5 - Infiltrado inflamatório – A:Corte histológico do ventrículo esquerdo do animal 95 infectado experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi* demonstrado pela coloração HE (10X): Detalhe evidenciando depósito de lipofuccina em cardiomiócitos (40X).

Figura 6 - Tecido cardíaco – Cortes histológicos corados com HE demonstrando o tecido cardíaco do animal 90 (Infectado): A:Ventrículo direito (10X); B: ventrículo esquerdo (10X); C: átrio esquerdo (10X) D: átrio direito corado com Tricômio de Masson. (10X)

Figura 7 - Tecido cardíaco – Cortes histológicos corados com HE demonstrando o tecido cardíaco do animal 99 (infectado): Ventrículo direito (A), ventrículo esquerdo (B) e átrio esquerdo (C). D: átrio esquerdo corado com Tricômio de Masson. (10X)

Figura 8 - Tecido cardíaco – Cortes histológicos corados com HE demonstrando o tecido cardíaco do animal 81 (controle): A:Ventrículo direito (10X); B: ventrículo esquerdo (20X); C: átrio esquerdo (20X); D: átrio esquerdo corado com Tricômio de Masson. (10X)

Figura 9 - Tecido cardíaco – Cortes histológicos corados com HE demonstrando o tecido cardíaco do animal 94 (controle): A:Ventrículo direito (10X); B: ventrículo esquerdo (20X); C: átrio esquerdo (10X); D: átrio direito corado com Tricômio de Masson. (10X)

Figura 10 - **Fibrose** – Corte histológico do átrio direito do animal 95 infectado experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi*, demonstrando extensa fibrose, demonstrada pela coloração de Tricômio de Masson (10X).

Figura 11 - Fibrose – Corte histológico do átrio esquerdo do animal 64 infectado experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi*, demonstrada pela coloração de Tricômio de Masson (20X). Detalhe no mesmo aumento da lesão visualizada na coloração HE.

Figura 12 - Imunohistoquímica de cortes criopreservados de ventrículo esquerdo do animal 64. . A: IFN γ (40 X); B: IFN γ (100 X); C: iNOS (40 X); D: iNOS (100 X); E: IL-4 (40 X); F: IL-4 (100 X); G: IL-10 (100 X); H: controle negativo (20X).

Figura 13 – Imunohistoquímica de cortes criopreservados de ventrículo esquerdo do animal 95 - A: IFN γ (40 X); B: IFN γ (100 X); C: iNOS (40 X); D: iNOS (100 X); E: IL-4 (100 X); F: IL-12 (40 X); G: CD68 (40 X); H: controle negativo (20X).

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Etiologia e ciclo evolutivo	1
1.1.1. No hospedeiro invertebrado	2
1.1.2. No hospedeiro vertebrado	3
1.1.3. Invasão celular	3
1.2. Transmissão, epidemiologia e controle	4
1.3. Patogenia	6
1.3.1. O coração	8
1.4. Modelos experimentais	9
1.4.1. Primatas não-humanos	11
1.5. Imunopatogenia	13
1.5.1. O óxido nítrico e o controle da patogenia	15
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Animais de experimentação	21
3.2. Ensaio imunoenzimático	22
3.3. Eutanásia	23
3.4. Obtenção dos fragmentos cardíacos	23
3.4.1 Cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos (AUI)	24
3.4.1.1. Preparo das lâminas para coloração	24
3.4.1.1.1. Hematoxilina e Eosina	25
3.4.1.1.2. Tricômio de Masson	25
3.5. Estereologia	26
3.6. Morfometria	26
3.7. Imunohistoquímica em cortes criopreservados	27
3.8. Diagnóstico clínico	29
3.8.1. Avaliação da forma cardíaca	29
3.11. Diagnóstico histopatológico	30
3.12. Avaliação final	30
4. RESULTADOS	31
4.1. Animais de experimentação	31
4.1. 1. Histórico clínico	31
4.1.1.1. Macaco 64	31
4.1.1.1.1. Fase aguda	32
4.1.1.1.2. Fase crônica	32
4.1.1.2. Macaco 90	33
4.1.1.2.1. Fase aguda	33
4.1.1.2.2. Fase crônica	34
4.1.1.3. Macaco 95	34
4.1.1.3.1. Fase aguda	34
4.1.1.3.2. Fase crônica	35
4.1.1.4. Macaco 99	36

4.1.1.4.1. Fase aguda	36
4.1.1.4.2. Fase crônica	36
4.1.1.5. Macaco 103.....	37
4.1.1.5.1. Fase aguda	37
4.1.1.5.2. Fase crônica	38
4.1.1.6. Macacos 81 e 94	38
4.2. Estudos <i>Post mortem</i>	39
4.2.1. Avaliação estereológica	39
4.2.2. Avaliação histopatológica e morfométrica	41
4.2.2.1. Análise do infiltrado inflamatório	41
4.2.2.2. Fibrose	50
4.2.3. Avaliação da presença de citocinas e iNOS em VE	54
4.2.4. Diagnóstico clínico e histopatológico	58
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
Anexo 1	84
Anexo 2	89

1 INTRODUÇÃO

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas é uma antropozoonose que existe no Continente Americano principalmente nas Américas Central e do Sul. É endêmica em 21 países, estendendo-se, sobretudo, do México até o sul da Argentina e estima-se hoje que 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas e cerca de 100 milhões de pessoas sob risco de infecção (WHO/TDR, 2004). Também constitui um problema de saúde pública no nos Estados Unidos, principalmente pela transmissão por transfusão de sangue e doação de órgãos (Cross, 2005).

Acredita-se que a doença de Chagas é antiga, advinda de populações nativas da América, onde se expandiu na era pós-colombiana devido a intensas mudanças no âmbito demográfico e ecológico, causados pelas conquistas hispânicas e portuguesas, possivelmente entre os séculos XVIII e XIX, onde o deslocamento populacional proporcionou o contato entre homem, vetores, parasitas e reservatórios (Dias & Coura, 1997). Sua maior incidência pode ter ocorrido na primeira metade do século XX, onde a partir da década de 40 a endemia se urbanizou devido às intensas migrações das populações rurais para as cidades (revisto por Coura et al., 1999).

1.1 Etiologia e Ciclo Evolutivo

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado pertencente à classe *Mastigophora*, ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae*. Apresenta como vetores os insetos hematófagos (triatomíneos) da ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae*, sendo as espécies *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *T. pseudomaculata* e *Panstrongylus megistus* as de maior importância médica no Brasil. São denominados popularmente, de acordo com a região, como barbeiros, bicho-de-parede, bicimo, chupão, fincão, procotó ou vum-vum. (Burleigh & Andrews, 1995).

1.1.1. No Hospedeiro Invertebrado

Os triatomíneos são os hospedeiros intermediários da doença de Chagas, infectam-se quando picam hospedeiros vertebrados contaminados, ingerindo as formas tripomastigotas sanguíneas que passam por uma série de transformações morfológicas irreversíveis no trato gastrointestinal do inseto, resultando na liberação das formas infectantes – os tripomastigotas metacíclicos – que são liberados nas fezes do inseto no momento da picada. Estas transformações morfológicas se iniciam no estômago do inseto, onde as formas tripomastigotas se diferenciam em esferomastigotas, que migram para o intestino e se diferenciam em epimastigotas para então, na ampola retal, assumirem a forma de tripomastigotas metacíclicas, que serão eliminadas por toda a vida do vetor (Chagas, 1909), como ilustrado na Figura 1.

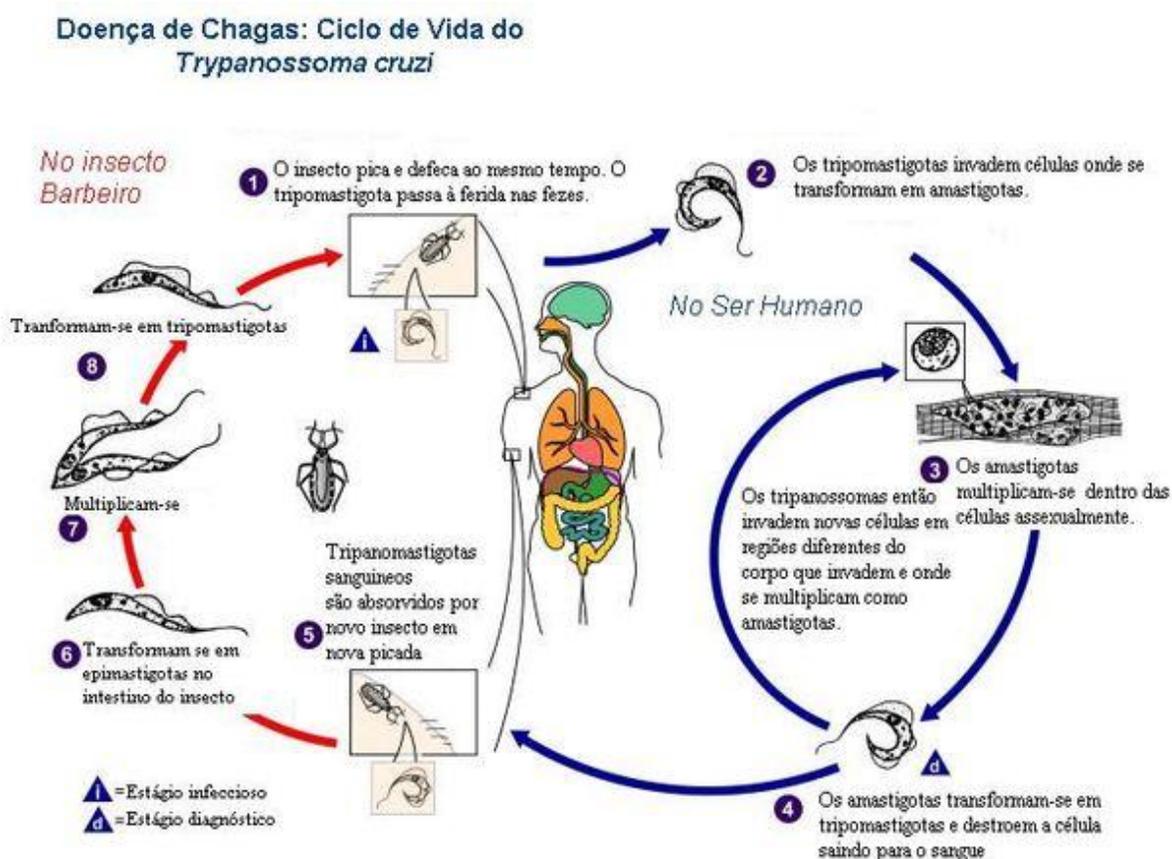


Figura 1: Ciclo Evolutivo da doença de Chagas. A. No hospedeiro invertebrado. B. No hospedeiro vertebrado.

Fonte: WHO/TDR (2004) .

1.1.2. No Hospedeiro Vertebrado

As formas tripomastigotas metacíclicas infectam o hospedeiro vertebrado através da picada dos vetores, ganham a corrente sanguínea ou invadem as células ficando inicialmente em um vacúolo ligado à membrana e iniciam seu ciclo intracelular que pode durar em média de 4 a 6 dias. O primeiro passo do ciclo é a ruptura do vacúolo que ocorre de 1 a 2 horas após a infecção e a multiplicação no citoplasma. Ao atingirem o citoplasma, os parasitos se diferenciam em amastigotas. Após um período de aproximadamente 20 horas, estas se diferenciam em tripomastigotas por divisão binária e rompem as células atingindo a corrente sanguínea. Em seguida as formas tripomastigotas sanguícolas podem invadir novas células e/ou serem ingeridas por um inseto vetor e completar o ciclo de vida (revisto por Burleigh & Andrews, 1995), como ilustrado na Figura 1.

1.1.3 Invasão Celular

A invasão das formas tripomastigotas em macrófagos não ativados é facilitada pela agmatina ou poliaminas secretadas. Uma vez no citoplasma as formas amastigotas proliferam utilizando a putrecina e a L-arginina para formar poliaminas. Após diversos ciclos de divisão binária, ocorre a transformação das amastigotas em tripomastigotas, que vão causar a ruptura da célula e a liberação destes, propagando-se assim a infecção. IFN γ TNF α e IL-1 (citocinas Th1) ativam macrófagos para eliminar os parasitas através da indução de determinadas enzimas, incluindo a iNOS, que gera NO em níveis micromolares.

A fagocitose através de receptores de IgG leva a ativação da NADPH oxidase e produção do íon peróxido, potencializando a citotoxicidade do NO pela formação do peroxinitrito, moléculs com ação tripanocida. A invasão pelo *T. cruzi* aumenta a expressão de receptores de vitronectina (VnR) nos macrófagos e a ingestão de células apoptóticas do hospedeiro através desse receptor levando a secreção de TGF β . Esta citocina vai dirigir o metabolismo da L-arginina pra a síntese de putrecina através da indução da arginase I e a supressão da iNOS e este favorecimento facilita a proliferação das formas amastigotas. O crescimento dos parasitas pode ser limitado pela pressão do sistema imune em parte através da produção

de altos níveis de NO (Peluffo et al., 2004). Contudo outros mecanismos podem ser responsáveis pela destruição das células cardíacas, dentre eles aqueles modulados pela presença de radicais intermediários de nitrogênio - RIN. Os RIN são formados a partir do aminoácido L-arginina por uma família de enzimas, as óxido nítrico sintases, produzidas por diversos tipos celulares. Radicais de nitrogênio (óxido nítrico - NO) são ativos apenas por segundos, e necessitam reagir com água e oxigênio para gerar nitrito e nitrato. Vários microrganismos são susceptíveis aos radicais de nitrogênio, como *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Cryptococcus neoformans* e *Schistosoma mansoni* (Nathan & Hibbs, 1991).

1.2 Transmissão, epidemiologia e controle

Classicamente as vias de transmissão da doença de Chagas incluem a transmissão por transfusão sanguínea, a vetorial, a congênita, por transplante de órgãos, por via oral e por acidentes laboratoriais. No entanto, diversos fatores alteraram consideravelmente o perfil e transmissão da doença no país e na América, devido a intensos programas de controle instituídos primariamente para erradicação da transmissão vetorial. As migrações rurais para áreas urbanas durante as décadas de 70 e 80 alteraram o padrão epidemiológico tradicional da doença de Chagas, fazendo com que ela se tornasse uma doença urbana transmitida principalmente pela transfusão de sangue. Entre 1960 e 1989, a prevalência de sangue infectado em bancos de sangue, em algumas cidades da América do Sul, como São Paulo, era de 1,7% comparado com 50% em Santa Cruz, na Bolívia, mostrando uma porcentagem de longe muito mais elevada que a da hepatite e o HIV. A perda econômica para o continente devido à prematura mortalidade e morbidade em jovens adultos produtivos somou cerca de US\$ 8.156 milhões, equivalente a 2,5% da dívida externa de todo o continente em 1995 (WHO/TDR, 2004).

Em junho de 1991, os Ministérios da Saúde dos Países do Cone Sul (Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) iniciaram o programa de iniciativa para a eliminação da doença de Chagas, criando uma comissão intergovernamental composta de representantes técnicos de cada ministério, que teve como função implementar e avaliar os programas de controle em cada país membro. A Colômbia em 1997, juntamente com o Equador, Peru e

Venezuela criou um plano de ação que tem como objetivo interromper a transmissão vetorial e transfusional até 2010. Dois países já foram declarados livres de transmissão: Uruguai em 1997 e Chile em 1999. Doze de 19 províncias endêmicas da Argentina foram declaradas livres da transmissão vetorial em 2000 e 2001. Dados atuais de bancos de sangue e resultados sorológicos em grupos de pessoas jovens indicam que a Bolívia e o Paraguai estão se movendo em prol da interrupção da transmissão (WHO/TDR, 2004). A Comissão Internacional de Especialistas constituída pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS) e pelos países do Cone Sul, com a finalidade de avaliar a situação epidemiológica de cada país, conferiu o certificado de interrupção da transmissão vetorial pelo *T. infestans* a dez estados brasileiros: São Paulo, Rio de Janeiro, Paraíba, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Tocantins e Piauí (Ministério da Saúde, 2004).

Após o cumprimento das ações de controle da transmissão da doença de Chagas, observou-se que o quadro epidemiológico da doença foi alterado novamente no país. Segundo o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas de 2005, o risco de transmissão depende, em menor escala, da: i. persistência de focos residuais do *T. infestans* em alguns estados; ii. da existência de grande número de espécies autóctones ou potencialmente vetoras, ou ainda de novas espécies de vetores (*T. rubrovaria*, *Panstrongylus lutzi*); iii. da emergência de transmissão endêmica na Amazônia por mecanismos excepcionais (vetorial domiciliar sem colonização, vetorial extradomiciliar e oral); iv. de episódios de transmissão oral e v. das regiões originalmente de risco para a transmissão vetorial (no Brasil, compreende os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Paraná Rio Grande do Norte, Sergipe, São Paulo e Tocantins).

Mesmo tendo atingindo um estágio de controle vetorial e transfusional, e mesmo não tendo mostrado a mesma freqüência assinalada em outros países, a transmissão congênita do *T. cruzi* no Brasil (com uma prevalência de 1% comparada a de 4 a 12% nos países do Cone Sul) passa a ser o principal mecanismo de transmissão da doença no país. É considerada em crianças nascidas de mães com sorologia positiva para *T. cruzi* com identificação de parasitas no sangue do recém nascido e/ou anticorpos não maternos após 6 a 9 meses de idade. Através do Programa Nacional de Triagem Neonatal, com a instituição

do “teste do pezinho”, tornou-se possível a identificação de casos positivos, com notificação obrigatória. Estes casos são então encaminhados ao Serviço de Referência da Triagem Neonatal, onde mãe e neonato passam por testes sorológicos e são acompanhados durante o curso da doença. Por outro lado, a via de transmissão oral, raramente documentada, recentemente foi relatada como responsável por um grave surto da doença no estado de Santa Catarina, a partir da ingestão de caldo de cana, em um único ponto de venda nas margens da BR 111 (Barracão Penha II), no município de Navegantes em 13 de Fevereiro de 2005. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) acompanhou os trabalhos de investigação desenvolvidos pelo órgão de vigilância sanitária estadual, visando avaliar a situação através de pesquisas epidemiológicas e a propor medidas de controle de âmbito nacional (ANVISA, 2005; FIOCRUZ, 2006)

1.3 Patogenia

A infecção chagásica inicia-se quando o *T. cruzi* atinge a corrente sanguínea, caracterizada por uma fase aguda que pode ou não ser sintomática, ausente de sintomas patognomônicos, com duração de aproximadamente dois meses. Após o rompimento das células pelo *T. cruzi*, o processo inflamatório se inicia desencadeando a ativação da resposta imunológica que irá controlar ambos, parasitismo e processo inflamatório até a sua aparente resolução (Talvani et al., 2000). A presença de anticorpos IgM específicos contra as formas circulantes do parasita são normalmente encontrados em altos níveis durante o curso da infecção aguda. A progressão da fase aguda para a fase crônica na doença de Chagas coincide com o desaparecimento dos parasitas da circulação sanguínea, limitando-se apenas a raros ninhos teciduais. Este período pode durar até cerca de 20 anos e é conhecido como a período ou forma indeterminada da fase crônica da infecção, onde os sintomas clínicos ou lesões histopatológicas significantes não são claramente evidenciados (Soares & Santos, 1999). A fase crônica tradicionalmente é dividida em quatro formas: i: a forma indeterminada, que consiste de um longo período de pouca ou nenhuma sintomatologia e ausência de parasitemia circulante; ii: a forma cardíaca, que envolvem as lesões cardíacas e/ou cardiomiopatia; iii: a forma digestiva, que é caracterizada pela presença de megacólon e/ou megaesôfago e iv: a forma mista, mais rara, com

acometimento cardíaco e digestivo. Cerca de 70% dos indivíduos infectados permanecem na forma indeterminada da fase crônica da doença, sendo que de 5 a 10% destes podem desenvolver uma denervação da musculatura lisa parietal do trato digestivo, desenvolvendo a forma digestiva. A fase crônica sintomática desenvolve-se em cerca de 25 a 30% dos indivíduos infectados, 5 a 30 anos após a infecção primária (Teixeira et al., 1990; Anez et al., 1999; Cunha-Neto & Kalil, 2001), sendo as patologias desta fase as causas responsáveis pelos índices de morbidade e mortalidade diretamente relacionados com a doença de Chagas (Moore & Rowland, 2004).

A correlação entre a fase aguda e o desenvolvimento da fase crônica sintomática na doença de Chagas tem sido alvo de vários estudos. Higuchi et al.(1993) mostraram que a intensidade de miocardite em fase crônica estava diretamente correlacionada com os níveis de antígenos de parasitas no tecido cardíaco humano. Marinho et al. (1999) apontaram que a carga parasitária durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* afetou a parasitemia, a patologia e a resposta imune na fase crônica tardia da doença em camundongos infectados com 10^5 formas sanguíneas de *T. cruzi* (cepa Y), havendo miocardite e miosite graves comparados com os camundongos infectados com dose menor de parasitas. Do mesmo modo, estudos sobre marcadores com possíveis valores prognósticos são desenvolvidos no intuito de identificar precocemente os indivíduos infectados que possivelmente desenvolveriam quadros mais graves na evolução da doença. Georg (2005) verificou que em pacientes com cardiopatia mais avançada os níveis séricos de IgE total se apresentaram acima da faixa de normalidade, independentes do período de evolução da doença. López et al. (2006) verificaram uma associação entre a fase evolutiva da doença de Chagas e as concentrações séricas de IL-6 e da proteína C reativa (PtC ou CRP). A concentração sérica de PtC aumentou apenas durante a fase mais avançada da doença e as altas concentrações de IL-6 indicaram uma associação com o aumento do índice de massa ventricular de pacientes chagásicos. Contudo, o acometimento cardíaco, que varia desde anormalidades silenciosas até as formas graves, como a insuficiência cardíaca ou morte súbita, é sem dúvida alvo de diversos estudos.

As manifestações mais importantes da doença de Chagas são as lesões de caráter irreversível no tecido cardíaco, caracterizadas por miocardite aguda e crônica com alterações eletrocardiográficas e insuficiência cardíaca progressiva. O órgão se apresenta

dilatado e, ao nível histológico, observa-se comumente infiltrados inflamatórios focais ou difusos com degeneração e necrose de fibras musculares, além da fibrose (Laranja et al., 1956; Rosembaum, 1964; Carrasco et al., 1987; D'Avila Reis et al., 1993). Durante a fase aguda, as células miocárdicas encontram-se parasitadas com amastigotas que se multiplicam e rompem as células. Na fase crônica, ocorre o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica, que é uma cardiomiopatia dilatada inflamatória que pode levar à morte, caracterizada por uma miocardite difusa, predominantemente mononuclear, rica em linfócitos T CD8⁺, com extensa fibrose onde raramente são encontrados ninhos de parasita nos cardiomiócitos. (Pereira et al., 1986; Mady et al., 1999; Cunha-Neto & Kalil, 2001). A gênese e a distribuição da inflamação explica o tipo de fibrose que progressivamente se desenvolve desde o início da infecção, porém apenas na cardiomiopatia chagásica crônica, se evidencia uma fibrose de caráter intenso e com características peculiares. A fibrose é difusa ou focal e na sua maioria interfascicular, advinda primeiramente do endomísio como uma substituição da perda de cardiomiócitos ou como fibrose cicatricial de foco inflamatório em resolução. Um aumento de estruturas tendíneas e colágeno são observados no perimísio juntamente com um aumento difuso do colágeno do endomísio. A fibrose focal ou difusa interrompe parcial ou totalmente os feixes musculares, atingindo o perimísio, alterações estas que acarretam sérios distúrbios no ritmo cardíaco (revisto por Caliari et al., 2002)

1.3.1 O Coração

Os primeiros estudos topográficos em corações chagásicos crônicos mostraram que as lesões inflamatórias afetam primeiramente os ventrículos, especialmente o ventrículo esquerdo, para depois atingirem os átrios (Laranja et al., 1951; Torres, 1941). Com relação ao parasitismo na fase crônica, colorações histológicas convencionais, por sua vez, podem não identificar os parasitas no tecido, porém a técnica de imuno histoquímica pode identificar antígenos de *T. cruzi*, principalmente no septo e parede livre do ventrículo esquerdo de indivíduos que desenvolveram a fase crônica da doença (Higuchi et al., 1993). As únicas formas de detecção de dano miocárdico podem ser as alterações discretas e inespecíficas do eletrocardiograma. Posteriormente, o dano se manifesta como uma

síndrome que inclui a insuficiência cardíaca, arritmias ventriculares graves e tromboembolismo pulmonar e sistêmico, muitas vezes culminando na colocação de marcapassos para garantia de vida. O traçado eletrocardiográfico tem sido utilizado como critério clínico por muitos investigadores devido ao lento desenvolvimento das lesões cardíacas em pacientes chagásicos, uma vez que os dados eletrocardiográficos, aliados à clínica e, ainda aos achados ecocardiográficos são necessários para classificar os pacientes e avaliar sua sobrevida (Xavier et al.; 2005). Além disso, estudos com novas aplicações terapêuticas estão sendo realizados utilizando-se os traçados eletrocardiográficos como referência de progressão ou regressão da cardiopatia chagásica. Zulantay et al. (2005) estudaram a persistência dos parasitas em pacientes chagásicos crônicos tratados com itraconazol e alopurinol e sua relação com a evolução ou regressão da doença baseados nos achados eletrocardiográficos. Desta forma foi verificado que os efeitos benéficos dos fármacos sobre a evolução do traçado eletrocardiográfico parecem ser independentes da condição parasitológica dos pacientes.

1.4 Modelos Experimentais

Desde a sua descoberta por Carlos Chagas em 1909, a doença de Chagas vem sendo estudada em diferentes espécies animais no intuito de responder a diversas questões referentes aos mecanismos fisiopatológicos que levam à expressão clínica da doença após muitos anos de infecção, uma vez que muitas são as limitações para as investigações diretas no homem. No entanto, ainda não foi proposto um modelo experimental que fosse satisfatório em reproduzir aspectos da doença em padrões comparativos à infecção humana.

O modelo animal ideal deve ser resistente ao *T. cruzi* na fase aguda e deve manifestar a fase crônica tardia, desenvolvendo assim todas as fases da doença que ocorrem em humanos naturalmente infectados, desenvolvendo também todos os aspectos patofisiológicos encontrados em humanos (Teixeira et al.,1983). A maioria dos estudos concentra-se na utilização de camundongos e ratos como modelos experimentais para a doença de Chagas, por serem animais de fácil aquisição e por desenvolverem a doença num curto período de tempo, porém não demonstram todos os perfis patológicos que são

desenvolvidos na doença humana. Contudo, mesmo nestas condições, estes modelos propiciam dados importantíssimos que oferecem aos pesquisadores um acesso rápido a informações de pesquisa básica que muitas vezes não seriam reprodutíveis em tempo hábil em outros modelos.

Diferentes linhagens de camundongos são utilizadas para o estudo da infecção experimental, uma vez que é um modelo que apresenta grande heterogeneidade em relação ao curso e intensidade da doença, características estas intimamente relacionadas com a combinação entre as cepas do *T. cruzi* (e ainda o inóculo) e a linhagem do camundongo escolhida. É um modelo capaz de proporcionar ao pesquisador sua manipulação genética, podendo ser produzidos camundongos mutantes ou *knock outs* (Araújo-Jorge, 2000). As linhagens de camundongos mais utilizados entre os pesquisadores em doença de Chagas são o Balb/c e em seguida C3H (425 referências encontradas na base de dados Medline com as palavras-chave “Balb/c e Chagas disease” e 240 com as palavras-chave “C3H e Chagas disease” em fevereiro de 2006).

O rato desenvolve uma infecção lenta e pouco evidente, necessitando de altos inóculos para que a infecção se instale de forma a compreender todos as fases da doença. São utilizados para estudos histopatológicos do coração, trato digestivo e do sistema nervoso central pois desenvolvem lesões similares às encontradas na doença de Chagas humana (396 referências encontradas na base de dados Medline com as palavras-chave “Rats e Chagas disease” em fevereiro de 2006).

Kummer et al. (2005), estudando os efeitos do desenvolvimento de ganglionite em tecido cardíaco de ratos na fase crônica da doença de Chagas, descobriram que estes animais apresentavam uma abundância de células apresentadoras de antígenos (APC) que foram correlacionadas com um aumento na permeabilidade das barreiras celulares e endoteliais o que promoveria uma proteção maior nestes indivíduos à partir de fatores sanguíneos e teciduais. Fabrino et al., (2004) verificaram que as células mononucleares do sangue periférico, recrutadas durante a fase aguda da infecção chagásica, teriam sua produção de NO inibida por mecanismos envolvidos com a ativação da arginase, enzima que afeta a síntese de NO.

Os cães são os únicos que desenvolvem as diversas formas clínico-patológicas da doença de Chagas humana (Araújo-Jorge, 2000). Guedes, et al (2002), investigaram o papel dos cães como modelos experimentais nas fases aguda e crônica da doença antes e após o tratamento com as drogas utilizadas no esquema terapêutico humano, sugerindo a relevância destes animais para os estudos sobre a quimioterapia da doença de Chagas. Bahia et al (2002) estudaram a influência da fonte do inóculo e a via de inoculação na evolução da infecção de cães, sugerindo que em hospedeiros vertebrados estes fatores interferem na taxa de infectividade e na evolução da infecção pelo *T. cruzi*. Estudos relativos às alterações histológicas em tecido cardíaco de cães foram comparados com as alterações eletrocardiográficas comumente encontradas na cardiopatia chagásica crônica em humanos, onde se encontrou relação entre a fibrose e a mudança do comportamento mecânico do miocárdio destes animais (Caliari et al., 2002).

O coelho vem sendo utilizado para o estudo da infecção chagásica desde a descoberta da doença por Carlos Chagas. (161 referências encontradas na base de dados Medline com as palavras-chave “Rabbits e Chagas disease” em fevereiro de 2006).

Teixeira et al em 1975 foram os primeiros a realizar estudos nesta espécie no intuito de avaliá-la enquanto modelo experimental. Em 1983 Teixeira et al demonstraram notáveis observações relativas às alterações miocárdicas em coelhos infectados pelo *T. cruzi*, dentre elas aumento da área cardíaca, insuficiência cardíaca congestiva, fenômenos tromboembólicos, alterações eletrocardiográficas e megacólon. Além disso, Silva, et al, 1996 notou que esses animais repetem algumas lesões similares as encontradas em pacientes chagásicos, especialmente aquelas da forma indeterminada.

1.4.1 Primatas não humanos

O interesse nos primatas como modelos experimentais advém de trabalhos pioneiros de Carlos Chagas que inoculou o *Callithrix penicillata* no intuito de observar o desenvolvimento da parasitemia que ocorreu 3 a 4 semanas após a inoculação (Chagas, 1909). Somente em 1934, após muitos anos de ausência de relatos sobre a utilização de primatas no estudo da doença, é que Wood retomou os experimentos com primatas não humanos, entre eles, os macacos rhesus (*Macaca mulatta*), verificando que mesmo com

uma parasitemia patente os macacos não apresentaram sintomatologia ou mortalidade. România (1939) verificou a formação de edema orbital em macacos infectados pelo *T. cruzi*; o inchaço unilateral encontrado comumente em humanos nesta região recebeu, mais tardiamente, o nome de Sinal de România. Davis em 1943 infectou 10 jovens macacos rhesus através da inoculação de fezes de triatomíneos infectados na mucosa ocular constatando que todos os animais se tornaram infectados e todos apresentaram o sinal de România no curso inicial da infecção. Com o intuito de utilizar culturas de *T. cruzi* tratadas com mertiolate, capaz de matar os parasitas, Muniz (1946) utilizou esta espécie para verificar o potencial vacinal desta preparação, e verificou que não houve proteção dos animais tratados com a ingestão da cultura em relação aos animais não tratados. Posteriormente, Torres e Tavares (1958) estudaram as diferentes vias de infecção nos macacos rhesus, utilizando-se das vias conjuntivais, cutânea e outras superfícies mucosas, verificando diferenças entre estas vias de inoculação e o curso da doença. Á partir da década de 70, Seah et al. (1974), em um trabalho envolvendo macacos rhesus vacinados com uma cultura liofilizada de *T. cruzi*, descreveram a fase aguda e fase crônica inicial da doença, que compreendeu do 217º ao 1258º dia pós infecção, demonstrando que não houve diferenças entre os animais vacinados e os controles (confirmando o trabalho desenvolvido por Muniz em 1946), e que os níveis de parasitemia por eles apontados eram compatíveis com a doença humana, apesar do foco do estudo ser direcionado a imunização.

No entanto, somente na década de 80, Bonecini-Almeida et al (1991) e Meirelles et al (1991) iniciaram um estudo pioneiro em macacos rhesus com o propósito de avaliar a fase aguda da doença correlacionando as alterações hematológicas e imunológicas com as manifestações clínicas da doença, incluindo avaliações eletrocardiográficas. Alguns animais foram ainda mantidos para que se pudesse alcançar a fase crônica tardia da doença. Desta forma, Carvalho et al (2003) acompanharam a fase crônica tardia e demonstraram não somente que estes animais desenvolvia alterações cardíacas compatíveis com a doença humana neste estágio, mas que também alguns permaneciam na forma indeterminada da fase crônica da doença, sem alterações cardíacas e digestivas. Os resultados detalhados da história clínica de alguns destes animais serão apresentadas posteriormente no item 4.1.2.

1.5 Imunopatogenia

Patógenos intracelulares podem rapidamente induzir a ativação de resposta imune efetora celular e humoral no hospedeiro infectado. No caso do *T. cruzi*, os mecanismos que favorecem seu crescimento persistente em diversos tecidos de mamíferos ainda não foram completamente caracterizados, porém existem razões para se acreditar que a diversidade molecular do *T. cruzi* pode afetar a dinâmica do envolvimento tecidual. Neste sentido, as várias formas clínicas da doença de Chagas podem estar relacionadas a essa diversidade genética e biológica de clones de *T. cruzi* que circulam nos reservatórios silvestres e domésticos (Diego et al., 1998; Scharfstaein & Morrot, 1999). Além disso, as diversas formas clínicas da doença de Chagas, e por sua vez as diferenças na severidade destas formas são influenciadas e estão relacionadas ao hospedeiro e ao parasita. Contudo, os mecanismos exatos que interferem na patogênese e resistência ainda precisam ser elucidados. É proposto que, grande parte das manifestações clínicas da doença de Chagas se deva à resposta imune dirigida ao parasita. No homem, a infecção pelo *T. cruzi* sensibiliza diferentes compartimentos do sistema imune, levando ao aparecimento de respostas humorais e celulares específicas contra o parasita (Higuchi, 1997).

Embora inúmeros trabalhos em modelos experimentais tenham definido a importância das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ na infecção pelo *T. cruzi*, esse aspecto não se encontra totalmente definido na doença de Chagas. Em camundongos, a supressão de genes de MHC de classe I e/ou II mostra uma correlação direta entre a presença de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ na patogênese da miocardite chagásica (Tarleton et al., 1996). Clones de células T obtidos a partir das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes chagásicos assintomáticos são predominantemente TCD4⁺, enquanto aqueles obtidos a partir de pacientes com sintomas cardíacos ou gastrintestinais são preferencialmente células CD8⁺, sugerindo uma possível participação dessas células nos mecanismos imunopatológicos (Cuña & Cuña, 1995). De fato, observações por imunohistoquímica em tecido cardíaco, obtidas em autopsias de pacientes com cardiomiopatia chagásica grave, mostraram que as lesões inflamatórias eram principalmente caracterizadas por linfócitos T CD8⁺, muitos dos quais expressavam granzima A, além de macrófagos expressando TNF- α e poucas células NK e linfócitos B.

Esses achados são compatíveis com conceitos envolvendo citotoxicidade e fibrose e sugerem a participação das células T CD8⁺ na destruição da miofibra cardíaca na cardiopatia chagásica. Além disso, observou-se a expressão aumentada de moléculas de HLA-classe I nas células miocárdicas de pacientes chagásicos com cardiopatia crônica, reforçando-se que elas podem ser alvos para a citotoxicidade mediada por linfócitos TCD8⁺ (Reis et al., 1993; Santos et al., 2001).

Foi observado no modelo murino que o predomínio de células T CD8⁺ ativadas no tecido cardíaco está associado à presença das quimiocinas RANTES e MIP-1 α , citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ , TNF- α , e da molécula de adesão VCAM-1 no endotélio dos vasos sanguíneos cardíacos (Santos et al., 2001). Estes resultados sugerem que a interação das moléculas de adesão (VLA-4) presentes nas células circulantes com as moléculas de adesão (VCAM-1) presentes nas células endoteliais do tecido cardíaco participem do processo de migração das células T CD8⁺ ativadas para o tecido infectado, sendo este processo orquestrado pela liberação de IFN- γ , TNF- α , RANTES e MIP-1 α . □ Uma vez no tecido infectado, os linfócitos T CD8⁺ podem participar dos processos de controle do parasitismo e/ou perpetuação dos processos inflamatórios, através de sua ação citotóxica ou das citocinas produzidas (Santos et al., 2001).

A identificação de poucos focos de parasitismo nos pacientes cronicamente infectados, levou a hipótese de que o parasitismo em si não seria suficiente para causar a infiltração inflamatória, sugerindo um possível envolvimento da autoimunidade na patogênese da cardiomiopatia chagásica crônica. Como as células mais comumente recrutadas são os linfócitos T, com a ativação de um padrão Th1 de resposta, aliado ao aumento na expressão de HLA classe I pelos cardiomiócitos, a geração de dano tecidual poderia estar associada a indivíduos suscetíveis. Nestes casos o repertório de linfócitos T poderia desenvolver uma reação cruzada com algum antígeno próprio cardíaco, causando uma hipersensibilidade tardia mediada por linfócitos que migrariam ao tecido e causariam lesão (Cunha-Neto & Kalil, 2001).

1.5.1 O Óxido Nítrico e o controle da patogenicia

A partir de estudos sobre o metabolismo da nitrosamida na carcinogênese e da atividade anti-tumoral de macrófagos, nas décadas de 80 até a década de 90 surgiram evidências de que os macrófagos poderiam gerar moléculas de ação citotóxica e que mais tardiamente seriam denominadas de radicais intermediários de nitrogênio - RIN, e que contribuiriam com a habilidade de macrófagos em inibir uma grande variedade de patógenos intra e extracelulares (Revisto em Nathan & Hibbs, 1991). Desde esta descoberta, uma ampla atenção foi sendo dada especialmente ao NO, como uma nova classe de molécula mensageira que apresenta uma variedade de funções em diferentes tecidos (Madison, 1993).

O NO é uma das dez menores moléculas da natureza. Era considerado somente como um produto de degradação resultante da combustão dos derivados do petróleo que aparece na fumaça emitida pelos motores e por conseqüência, um contaminante tóxico para atmosfera que causa a chuva ácida e que destrói a camada de ozônio (Luksic, 2005). Para a biologia, não é somente um gás, mas apresenta propriedades dos radicais livres (RL) com grande instabilidade e vida curta, difundindo-se por qualquer ponto da membrana da célula produtora para atuar intercelularmente sem a necessidade de transportadores. Está implicado em diversos processos biológicos como ativação de fatores de transcrição, translocação de RNAm, metabolismo de ferro, mutagênese, apoptose, glicólise, transporte de elétrons mitocondriais, adesão plaquetária e de neutrófilos, proliferação dos promotores de células mielóides, produção de células T, queratinócitos e células tumorais, liberação de hormônios pituitários, regulação do tônus brônquico e dos esfíncteres, regulação do peristaltismo esofágico, contração do estômago, intestino, útero e coração, regulação pulmonar, ereção da pele e regulação da memória, sono e pressão sanguínea. Em processos patológicos são encontrados altos níveis de produção de NO associados com a citotoxicidade celular não específica mediada pela ativação de processos imunes e, portanto, relacionado com certas afecções crônicas, como por exemplo, os processos inflamatórios autoimunes (Revisto por Rodrigo et al., 2000).

O NO é um radical livre relativamente estável e difusível que em baixas concentrações funciona como molécula mensageira através da ativação da guanilato ciclase solúvel. Em processos patológicos, encontra-se em altas concentrações (micromolar) e age,

neste caso, como uma molécula citotóxica do sistema imune. É sintetizado a partir do substrato L-arginina, reação esta catalizada por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases – NOS. As NOS podem ser constitutivas ou induzidas e podem coexistir em diferentes tipos celulares (Green & Nacy, 1994). As formas constitutivas são dependentes da calmodulina, proteína fixadora de cálcio, que se ativam através de estímulos tais como acetil colina, bradicinina e ADP, e são subdivididas nas formas endotelial (e-NOS, NOS tipo III, NOS-3, ecNOS), neuronal (n-NOS, NOS-1, bNOS, ncNOS) e a mitocondrial (mtNOS) (Revisto por Molina, et al., 2004). Já a forma induzida da NOS, a iNOS (NOS tipo II, NOS-2, macNOS, hepNOS) é ativada principalmente em macrófagos ativados.

A L-arginina é um aminoácido semi-essencial para os humanos e suas concentrações diferem dependendo do tipo celular numa média de 0,1 a 1 milimolar. É adquirida pelas células a partir da captação via transportadores específicos e o metabolismo da L-arginina nas células de mamíferos é composto de diversas vias metabólicas (Figura 2). Durante a oxidação da L-arginina pela NOS, um componente intermediário, a N^G-hidroxi-L-arginina (NOHA) é formado, servindo como um potente inibidor da arginase, enzima responsável pela formação da ornitina, que dará origem as poliaminas agmatina, putrecina e espermidina. Estas poliaminas são aminas alifáticas que estão amplamente distribuídas entre as espécies e apresentam funções distintas durante a proliferação celular e diferenciação e síntese de macromoléculas. Existem duas isoformas da enzima arginase nas células de mamíferos: a arginase I que é citosólica e é induzida por citocinas Th2 e a arginase II, que é mitocondrial e constitutivamente expressa. Alternativamente, a L-arginina pode ser descarboxilada pela arginina descarboxilase (ADC) e produzir agmatina que, por sua vez, é hidrolisada pela agmatinase, gerando putrecina e uréia. Finalmente, a L-arginina é precursora da fosfocreatina e fosfoarginina, que servem como fontes de renovação de ATP (revisto por Peluffo et al., 2004).

Como existem diversos trabalhos que indicam a atividade microbida realizada por macrófagos ativados, estudos têm sido propostos para avaliar os possíveis estímulos que desencadeariam tal atividade. Green e Nacy (1994) indicam que os estímulos que induzem a atividade microbida incluem citocinas e produtos de origem microbiana. No entanto, o IFN γ é o responsável por induzir com mais propriedade os altos níveis de NOS numa

Infecção, atuando em sinergismo com LPS, MDP (muramil dipeptídeo) e TNF α ou com β toxinas bacterianas e protozoários que também são potentes ativadores de TNF α .

Estudos experimentais confirmaram que no miocárdio de animais chagásicos agudos ocorre a persistência de iNOS em altos níveis até quinze dias pós-infecção, além da ativação precoce do sistema NOS com danos oxidativos para o tecido (Chandrasekar, et al., 2000). O NO pode contribuir para o controle da infecção aguda e o estabelecimento da infecção crônica pelo T. cruzi, pois exerce um papel crítico na resposta imune que controla a infecção (Millar & Kahn, 2000). Da mesma forma Chandra et al. (2002) demonstraram que além da presença de iNOS no tecido cardíaco, citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF α - e IFN- γ estavam presentes e que os radicais de nitrogênio liberados poderiam ser responsáveis pelo desenvolvimento e progressão da dilatação ventricular e disfunção sistólica na cardite chagásica experimental aguda.

Existem muitas fontes de NO no coração e no sistema nervoso autônomo e ambas as formas podem ativar vias bioquímicas discretas. Além disso, os mecanismos que governam a biodisponibilidade do NO são muitos e altamente sensíveis a fatores físicos e bioquímicos. Este NO gerado pelas formas constitutivas pode modular a função miocárdica e em situações de exercício ou ativação do sistema nervoso simpático (situações de estresse, por exemplo), pode ter ainda ações variadas na musculatura cardíaca de indivíduos portadores de doença cardíaca, potencializando-a. Por exemplo, um aumento da expressão de eNOS miocárdica tem sido observado em humanos com insuficiência cardíaca e em animais com cardiomiopatia dilatada. A nNOS pode estar aumentada após o infarto do miocárdio, sugerindo que as formas constitutivas sintetizam NO em situações fisiológicas e de estresse patofisiológico e podem ser responsáveis pelas alterações da sinalização autonômica-cardíaca vistas em atletas ou em doenças cardíacas (Danson, 2005).

Recentes relatos indicam que pacientes chagásicos crônicos possuem elevados níveis de óxido nítrico circulante, além de TNF- α e a superóxido desmutase – SOD, levando a cardite chagásica (Perez-Fuentes et al., 2003).

De modo interessante o próprio parasita desenvolveu mecanismos antioxidantes para escapar dos radicais de nitrogênio como peroxinitrito, podendo servir como mecanismo de escape e facilitando sua sobrevivência no ambiente intracelular (Thomson et al., 2003).

Assim, tanto a presença de radicais de nitrogênio, como citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias no tecido cardíaco durante a fase crônica da doença poderiam induzir as alterações miocárdicas descritas na cardiopatia chagásica crônica. Desta forma, temos como hipótese que a presença de iNOS estaria relacionada com a extensão das lesões cardíacas de fase crônica, sugerindo um possível papel deste radical na patogênese da lesão miocárdica crônica na doença de Chagas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o perfil clínico de macacos rhesus infectados por *T. cruzi*, associando os dados com alguns aspectos histopatológicos e imunológicos da infecção crônica cardíaca.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a expressão de iNOS e abundância de células CD68⁺ no músculo cardíaco;
2. Avaliar a expressão de IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-12 no tecido cardíaco
3. Avaliar a extensão da lesão miocárdica pela análise histopatológica, morfométrica e estereológica;
4. Associar a expressão da iNOS e citocinas com o desenvolvimento clínico da doença de Chagas experimental.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação.

Macacos rhesus (*Macaca mulatta*), adquiridos da colônia mantida pelo Centro de Primatologia do Centro de Criação Animal da Fundação Oswaldo Cruz, foram infectados quando possuíam em média 5,0 ($\pm 0,71$) anos de idade utilizando-se $1,5 \times 10^3$ formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* (cepa Colombiana) por quilo de peso. Os animais utilizados neste estudo foram infectados a cerca de 20 anos por Bonecini-Almeida e colaboradores (1991) e avaliados durante a fase aguda em relação à i: persistência da parasitemia, relacionada com a positividade da hemocultura e do xenodiagnóstico; ii: presença de anticorpos anti-*T. cruzi* e EVI (anti-endocárdio, vasos sanguíneos e interstício normais) e iii: análises eletrocardiográficas por até 3 anos após a infecção. Após este período (cerca de 16 anos da primo infecção), os animais foram novamente avaliados, longitudinalmente por um período de 20 meses, quanto à persistência da parasitemia, hemocultura, xenodiagnóstico, presença de kDNA circulante por PCR, análise biométrica (peso, temperatura corporal, perímetro torácico, comprimento do corpo e comprimento da cauda), alterações hematológicas (hemograma completo) e estudos sorológicos, radiológicos, eletrocardiográficos e ecocardiográficos (Carvalho et al., 2003). Mais recentemente, Carvalho et al. (2006, tese de doutorado) descreveram os perfis clínico, parasitológico e a resposta imune celular através de i: identificação da presença de parasitas ou kDNA do *T. cruzi* no sangue ou no tecido cardíaco; ii: estudo da produção de anticorpos e da resposta linfo-proliferativa de células T; iii: caracterização do potencial efetor da resposta imune através da dosagem dos metabólitos estáveis do NO e de citocinas séricas; iv: caracterização das populações celulares dos infiltrados inflamatórios e os mecanismos moleculares potencialmente envolvidos na migração celular e da expressão de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas; v: identificação da produção de citocinas pelas células TCD4⁺ e CD8⁺ e monócitos, além de sua capacidade de co-estimulação; vi: avaliação da fibrose e da expressão de conexina 43 (Anexos 1 e 2).

Nenhuma terapêutica indicada para o tratamento da doença de Chagas foi adotada nos animais infectados durante todo o período de infecção avaliado. Após 20 anos, os animais foram eutanasiados e submetidos à necropsia e amostras de sangue e tecidos foram

armazenadas no Serviço de Imunologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FIOCRUZ.

3.2 Ensaio Imunoenzimático

Durante a fase aguda, todos os animais apresentaram anticorpos anti-*T. cruzi*. Para podermos analisar longitudinalmente o desfecho parasitológico, estes dados foram levantados a partir de Bonecini-Almeida et. al, 1991. Na fase crônica, três análises foram realizadas, utilizando-se soros obtidos a partir de amostras armazenadas a -20°C , bem como a amostra obtida no momento da eutanásia, que compreendiam 15,6, 19,3 e 20 anos pós-infecção.

A determinação de anticorpos anti *T. cruzi* foi realizada através da utilização do Kit de Biomanguinhos (E.I.E – Chagas, Biomanguinhos), e os procedimentos seguiram as recomendações do fabricante. Cem microlitros de soro diluído dos controles do kit (controle positivo baixo, controle positivo alto e controle negativo) e dos animais controle e infectados, foram diluídos 1:100 e adicionados aos orifícios de uma microplaca previamente sensibilizada com antígenos solúveis e purificados de *T. cruzi* e incubados por 30 minutos a 37°C . Em seguida, seis lavagens com o tampão de lavagem do kit foram realizadas utilizando-se 200 μl por orifício. À seguir, 100 μl da solução de conjugado (anti-Ig total humana conjugada com peroxidase) foi adicionada à microplaca e incubada por 30 minutos a 37°C . Novamente foram feitas 6 lavagens para proceder a incubação por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz com 100 μl de peróxido associado ao cromógeno TMB (tetrametilbenzidina diluídos no tampão do substrato do kit). Sem desprezar o conteúdo da placa, 50 μl de ácido sulfúrico 2M foram adicionados em cada orifício a fim de bloquear a reação, para então ser feita a leitura da densidade ótica em espectrofotômetro com filtro de 450 nm. As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram densidade ótica igual ou superior ao valor do “Cut-off”, utilizando-se a seguinte equação para cálculo:

$$\text{CO} = \frac{\bar{X}_{\text{CPB}} + \bar{X}_{\text{CN}}}{2}$$

2

onde: CO: cut-off; \bar{X} CPB: densidade óptica do controle positivo baixo; \bar{X} CN: densidade óptica do controle negativo

3.3 Eutanásia

Após a contenção física feita através do dispositivo da própria gaiola em que os animais eram mantidos, foi realizada a contenção química através da administração intramuscular de cloridrato de ketamina, sob a dose de 70 mg/kg para obtenção de plano anestésico profundo. Os animais foram então eutanasiados por hipovolemia através de punção do sangue por via intracardíaca (Carvalho, 2006). À necropsia, fragmentos de diversos tecidos e órgãos, inclusive o coração, foram preservadas em OCT (Optimal cutting temperature compound – Tissue Teck, Sakura, USA) e em formalina a 10% e armazenados em nitrogênio líquido e à temperatura ambiente, respectivamente, para posterior análise. O tecido cardíaco remanescente foi mantido imerso em solução de formalina a 10%. A eutanásia foi realizada com supervisão do médico veterinário Renato Sérgio Marchevski (Biomanguinhos- FIOCRUZ).

3.4 Obtenção de fragmentos cardíacos

Fragmentos de parede livre com aproximadamente 1 cm foram coletados do átrio esquerdo e ventrículos direito e esquerdo em sua porção média a partir do material mantido em formalina a 10% com o auxílio do Dr. Carlos Alberto Mandarim de Lacerda (Laboratório de Morfometria – UERJ) e do Dr. Marcelo Pelajo (Laboratório de Patologia – IOC – FIOCRUZ).

3.4.1 Cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos (AUI)

Para que se pudessem adquirir cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos do tecido cardíaco dos animais infectados e controles, foi utilizado o “método do orientador” descrito por Mattfeldt (1990). Um fragmento de parede livre foi seccionado em dois cortes consecutivos, sendo o primeiro corte realizado em um ângulo determinado aleatoriamente. Após o corte, a face deste foi apoiada no plano da mesa e novamente o tecido foi seccionado em um ângulo aleatório. Os fragmentos obtidos foram então colocados em cassetes de forma randomizada, sem que houvesse a referência da posição das amostras no primeiro corte realizado. As amostras então foram fixadas em solução de formalina 10%, sendo mantidas nesta solução por no mínimo duas semanas para serem, então, submetidas ao preparo das lâminas.

3.4.1.1 Preparo das lâminas para coloração

Os fragmentos de tecidos acondicionados nos cassetes foram desidratados em banhos de soluções alcoólicas de concentrações crescentes (3 banhos de 3 minutos de álcool 70%, seguido de 1 banho de álcool 95% por 3 minutos e 3 banhos de 3 minutos cada de álcool absoluto). Posteriormente, as amostras foram diafanizadas em xilol (3 banhos por 3 minutos) para permitir a inclusão das mesmas em parafina filtrada. Em seguida foram realizados cortes AUI de 4 μ m os quais foram secos, desparafinizados e re-hidratados (3 banhos de 3 minutos de xilol, 3 banhos de álcool absoluto por 3 minutos, 1 banho de álcool 95% por 3 minutos, 1 banho de álcool 70% por 3 minutos e 1 banho de água destilada por 5 minutos) e corados com hematoxilina e eosina e Tricômio de Masson

Todas as colorações foram realizadas no Laboratório de Patologia do IOC-FIOCRUZ e submetidas à avaliação estereológica com a supervisão do Dr. Carlos Alberto Madarim de Lacerda (Laboratório de Morfometria da UERJ), histopatológica, com supervisão da Dra. Janice C. Coelho (Laboratório de Anatomia Patológica – IPEC) e morfométrica (Laboratório de Produção e Tratamento de Imagens – IOC).

3.4.1.1.1 Hematoxilina e Eosina

Os cortes foram corados conforme o Procedimento Operacional Padrão do Serviço de Anatomia Patológica do IPEC. As lâminas foram embebidas em hematoxilina por 3 a 5 minutos e lavada em seguida em água corrente. Os cortes foram diferenciados em álcool ácido a 1%, lavados em água corrente até a oxidação (10 minutos aproximadamente), tornando os cortes azulados. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em eosina por 1 minuto, escorridas e submetidas à desidratação em 4 a 6 trocas de álcool absoluto, levando 1 a 2 minutos em cada cuba. Foi realizado o clareamento em três trocas de xilol PA, 1 a 2 minutos por cuba para permitir a montagem de lâmina e lamínula.

3.4.1.1.2 Tricômio de Masson

Os cortes foram corados conforme o Procedimento Operacional Padrão do Serviço de Anatomia Patológica do IPEC. As lâminas foram embebidas por 10 minutos em hematoxilina férrica a 1% por 10 minutos, lavadas em água corrente até os cortes adquirirem a coloração azul e por último um banho de água destilada. Em seguida, as lâminas foram embebidas por 12 minutos em solução de Biebrich Escarlet, lavadas em água acética e embebidas por 12 minutos em ácido fosfotungstico e fosfomolibídico. Após, procedeu-se mais duas colorações, a primeira com solução de Orange por 5 minutos, com posterior lavagem em água acética e a segunda com solução de azul de anilina por 5 minutos e novamente lavagem em água acética. Rapidamente após este procedimento, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em 4 a 6 trocas de álcool absoluto, clareadas com 3 trocas de xilol PA e submetidas à montagem de lâmina e lamínula.

3.5 Estereologia

Dezoito campos de cada coloração foram escolhidos aleatoriamente para a avaliação de cada compartimento cardíaco (átrio esquerdo e ventrículos direito e esquerdo) dos animais controles e infectados, através de um sistema de teste contendo 36 pontos testes, sobreposto à tela do monitor de vídeo (Sony Triniton), acoplado ao microscópio óptico (Leica DMRBE) e a uma câmera de vídeo (Kappa CF 15/5), utilizando-se objetiva num aumento de 20 vezes (Gundersen et al. 1988). Foi calculada a densidade de volume (Vv) de cardiomiócitos (número de cardiomiócitos em um determinado volume) (VvCmy em %), de vasos (VvVe em %) e de tecido conjuntivo (Vvct em %), além do comprimento dos vasos (Lv ve em mm/mm³) e área de cardiomiócitos (A cmy em μm² - área de tecido cardíaco ocupada por cardiomiócitos) determinados pela contagem dos pontos, considerando-se os pontos que tocavam os miócitos, os vasos e o interstício cardíaco de acordo com a fórmula:

$$V_v(\text{estrutura}) = \frac{P_p(\text{estrutura})}{P_T}$$

sendo Pp[estrutura]= pontos sobre a estrutura em estudo e P_{totais} = 36

3.6 Morfometria

A análise morfométrica dos cortes AUI para quantificação de área de fibrose foi realizada em átrio esquerdo e ventrículos direito e esquerdo (corados com Tricômio de Masson) de animais infectados e controles através do software de análise Image Pro Plus (versão 4.5). Foram escolhidos aleatoriamente ao microscópio ótico 10 campos em aumento de 40 vezes, onde áreas totais e de processo fibrótico foram quantificadas. A partir

dos resultados coletados (em μm^2), foram feitas análises individuais obtendo-se a porcentagem de área com lesão em relação à área total dos campos avaliados.

Para avaliação da área de infiltrado inflamatório, foram utilizados cortes AUI corados com hematoxilina e eosina. As representações foram realizadas através da contagem do número de células contidas em cada campo. Foram escolhidos aleatoriamente 32 campos em aumento de 400 vezes. Foram mais uma vez avaliadas amostras de átrio esquerdo, ventrículos direito e esquerdo de animais infectados e controles e a quantificação de cada compartimento foi representada pela média do número de células encontradas por campos.

3.7 Imunohistoquímica em cortes criopreservados

A análise da expressão das citocinas, IL-4, IL-10 e IL-12, da molécula de superfície CD68 e da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) foi realizada em amostras de ventrículo esquerdo preservados em OCT e armazenados em nitrogênio líquido. Cortes de 3 μm de espessura foram fixados em lâminas previamente embebidas em álcool absoluto por 5 minutos e filmadas com uma solução de silano (3-aminopropiltreoxissilano - Sigma, USA) à 4% e acetona por 5 minutos para a realização da técnica de imunohistoquímica. Os cortes foram fixados por 20 minutos em acetona gelada e posteriormente lavados duas vezes em PBS contendo 0,1 % de saponina (Sigma, USA) por 10 minutos. Posteriormente, foi realizada a inibição endógena com o reagente de bloqueio da peroxidase do kit En Vision (Dako Cytomation, USA) por 10 minutos em temperatura ambiente, seguida de duas lavagens com água destilada e PBS com 0,1% de saponina. A inibição de ligações inespecíficas foi realizada utilizando-se soro de cavalo (Vector, USA) diluído 1:100 em PBS com 0,1% de saponina por 30 minutos à temperatura ambiente. Após remoção do soro, cada corte foi circundado com um marcador hidrofóbico (Pap Pen, Zymed - USA) para ser iniciada a incubação com os anticorpos primários em câmara úmida por 16 horas a 4°C. Em seguida, três banhos de 5 minutos cada em PBS com 0,1% de saponina foram realizados para iniciar a incubação do anticorpo secundário correspondente em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente (Tabela 6). Em seguida, foram necessárias três lavagens de

5 minutos cada em PBS com 0,1% de saponina para proceder a revelação com o DAB (Kit En Vision – DAKO - USA), controlando a reação através do uso de microscopia óptica. Para que a reação do cromógeno cessasse, as lâminas foram lavadas duas vezes em água destilada por cerca de 2 a 3 minutos cada. A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Harris (Merck, Germany) pura por alguns segundos, sendo lavadas em água destilada. Posteriormente, os cortes passaram pelo processo de desidratação que consiste em banhos consecutivos de álcool 70% por 3 minutos, álcool 96% por 3 minutos, álcool absoluto por 3 minutos e xilol por 5 minutos e submetidos à secagem em temperatura ambiente para posterior montagem de lâmina e lamínula (Entellan –MERCCK) e leitura em microscopia óptica (Leica - DMLB). Para a escolha dos anticorpos que apresentassem reação cruzada com macacos rhesus, um extenso levantamento bibliográfico foi realizado e os clones foram selecionados a partir de referências já anteriormente publicadas, como demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5: Anticorpos primários e secundários utilizados para a reação de imunohistoquímica

Anticorpo Primário	Clone	Tipo	Diluições	Anticorpo Secundário²
IL-4 ¹	82,4	mAb purificado	1:50	Mouse
IL-10 ¹	9D7	mAb purificado	1:50	Rat
IL-12 ¹	IL-12 I	mAb purificado	1:50	Mouse
CD68 ²	KP1	mAb purificado	1:50	Mouse
IFN ¹	GZ-4	mAb purificado	1:25	Mouse
iNOS ³	N-20	pAb	1:50	Rabbit

¹ Mabtech, USA; ² Dako Cytomation, USA; ³Santa Cruz Biotechnology, USA.

Rat: Polyclonal Rabbit Anti-Rat Immunoglobulins/Biotinylated; Mouse: En Vision Anti-mouse and Anti-rabbit Labelled Polymer, HRP – Dako Cytomation, USA.

Fontes : Calarota et al. (2003); Fuller et al. (2002); Makitalo et al. (2002); Zarlingo et al. (1997).

3.8 Diagnóstico Clínico

Os animais infectados foram diagnosticados conforme a gravidade da forma clínica (forma indeterminada da fase crônica ou fase crônica cardíaca) em estágios de acordo com as especificações da nova classificação da insuficiência cardíaca da American Heart Association (AHA) adotada pelo Consenso Brasileiro de Doença de Chagas de 2005 (Siciliano et. al.; 2006) e receberam um *score* de acordo com a classificação:

- Estágio A: ECG alterado e ECO normal
- Estágio B₁ : ECO alterado com fração de ejeção maior que 45% sem insuficiência cardíaca
- Estágio B₂ : ECO alterado com fração de ejeção menor que 45% sem insuficiência cardíaca
- Estágio C: Insuficiência cardíaca compensada
- Estágio D: Insuficiência cardíaca refratária

Os animais assintomáticos receberam o *score* no valor de zero. Os animais infectados que não apresentaram quadro sintomatológico próprio da doença e com resultados eletrocardiográfico de repouso, estudo radiológico de tórax, esôfago e cólon normais, foram caracterizados como pertencentes à forma indeterminada da doença de Chagas. Os pertencentes ao estágio A receberam *score* um e os pertencentes ao Estágio B₁ o *score* 2.

3.8.1 Avaliação da Forma Cardíaca

Embora o acometimento cardíaco na doença de Chagas inclua amplo espectro de manifestações que vão desde anormalidades silenciosas à insuficiência cardíaca refratária e morte súbita, caracterizamos os animais como portadores de cardiopatia chagásica crônica quando apresentaram arritmias (com alteração em frequência e complexidade do quadro clínico) e distúrbios da condução do estímulo átrio ventricular e intraventricular.

3.9. Diagnóstico histopatológico

A avaliação gravidade do acometimento histopatológico foi baseada a contagem das células inflamatórias e na quantificação da fibrose conforme descritos no item 3.8. Deste modo, obtivemos o diagnóstico histopatológico conforme o processo inflamatório e o acometimento fibrótico tecidual, onde utilizamos o sistema de *score* para classificar estes animais conforme o grau de lesão inflamatória e fibrótica. Recebeu o *score* 3 os animais que obtiveram maior acometimento (considerados graves), seguidos do *score* 2 (para os moderadamente acometidos) *score* 1 (levemente acometidos) em relação aos animais controles.

3.10 Avaliação final

Somamos os *score* de cada animal referentes ao diagnóstico clínico e ao diagnóstico histopatológico para, desta maneira, classificarmos os animais por gravidade.

4 RESULTADOS

4.1 Animais de experimentação

Nesta avaliação, foram incluídos cinco animais machos infectados pelo *T. cruzi* e dois animais controle mantidos sob as mesmas condições de manejo por um período de 20 anos.

Um estudo retrospectivo, realizado com o objetivo de coletar dados referentes a parasitemia patente, alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas durante a fase aguda e crônica dos animais foi realizado para a obtenção do histórico clínico de cada animal quanto a evolução da doença de Chagas experimental de longa duração. Após a eutanásia dos animais, foi proposto um estudo prospectivo, onde análises histopatológicas, morfométricas e estereológicas, juntamente com a determinação de citocinas pró e anti-inflamatórias, macrófagos e a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) foram então associados ao histórico clínico e caracterização da evolução clínica da cardiopatia chagásica.

4.1.1 Histórico clínico

A avaliação do histórico clínico compreendeu todo o período de análises realizadas durante a fase aguda e crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi* por Bonecini et al., 1990, Meirelles et al., 1990 e Carvalho et. al., 2003 e 2006.

4.1.1.1 Macaco 64

O animal 64 nasceu no ano de 1975 e foi infectado com $1,2 \times 10^3$ formas tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* por quilo de peso aproximadamente aos 6 anos de idade. Na época pesava cerca de 12 kg.

4.1.1.1.1 Fase aguda

Durante a fase aguda apresentou uma perda progressiva de peso até a 9ª semana p.i., tendo perda de 16,67% nesta semana. Este animal não apresentou chagoma de inoculação nem alterações em linfonodos axilares quanto à consistência, elasticidade e aderência. Não houve presença de hepatoesplenomegalia. A parasitemia direta foi detectada da 2ª a 7ª semana p.i., apresentando um pico de parasitemia (5×10^5 parasitas/ml) entre as semanas 4 e 7 p.i.

O exame eletrocardiográfico apresentou-se normal, porém a avaliação radiográfica revelou alteração do índice cárdio-torácico (ICT = 0,47 – 0,49), durante 20 a 26 dias p.i.. Nenhuma alteração digestiva foi encontrada.

Anticorpos IgM totais estavam aumentados logo a partir da 1ª semana p.i. (2 vezes o valor médio anterior à infecção, para este animal), tendo um aumento médio de cerca de 317,36% entre as semanas 1 e 8, enquanto os anticorpos IgM específicos anti *T. cruzi* foram detectados da 5ª a 18ª semana p.i. Anticorpos IgG totais não foram avaliados para este animal nesta fase. No entanto, anticorpos IgG específicos anti *T. cruzi* foram detectados à partir da semana 9 p.i..

4.1.1.1.2 Fase Crônica

Nas avaliações radiológicas de fase crônica, este animal não apresentou alteração no ICT. Contudo, o eletrocardiograma apresentou modificação das ondas S e T e repolarização ventricular anormal aos 19 anos pós infecção.

A detecção de anticorpos IgG específicos anti *T. cruzi* foi possível até o momento da eutanásia.

Os parasitas foram isolados por hemocultura e xenodiagnóstico na semana 115 p.i., e apresentando resultado negativo na semana 169 p.i.. Na fase crônica tardia, foi possível isolar o parasito por xenodiagnóstico após 18,4 anos.

O histórico clínico deste animal mostra que houve perda de peso que progrediu até a fase crônica tardia. Embora tenha apresentado alteração do índice cárdio-torácico,

visualizado pelos exames radiográficos, este animal não demonstrou quaisquer manifestações clínicas da doença durante todo o período da infecção experimental.

4.1.1.2 Macaco 90

O animal 90 nasceu em 22/11/1978 e foi infectado com $1,7 \times 10^3$ formas tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* por quilo de peso aproximadamente aos 5,7 anos de idade. Na época pesava cerca de 9,0 kg.

4.1.1.2.1 Fase aguda

Durante a fase aguda apresentou perda progressiva de peso até a 12^a semana p. i., que variou em cerca de 10,88%. Este animal não apresentou chagoma de inoculação. Os linfonodos axilares apresentaram-se infartados com consistência elástica e não aderentes. Não houve presença de hepatoesplenomegalia. A detecção de parasitas foi avaliada por métodos diretos e indiretos, compostos por avaliação da parasitemia, hemocultura e xenodiagnóstico. A parasitemia direta foi detectada entre a 3^a e 7^a semanas p. i., apresentando um pico de parasitemia na 6^a semana p. i. (4×10^5 parasitas/ml de sangue). Os parasitas foram isolados por hemocultura até a 32^a semana p. i. e o xenodiagnóstico apresentou positividade apenas na 11^a semana p. i..

Foram encontradas alterações eletrocardiográficas compatíveis com bloqueio átrio-ventricular de Grau I (BAV-I) e baixa voltagem de QRS (BVQRS) entre a 4^a e 8^a semanas p. i.. Nesta fase não foram realizadas avaliações ecocardiográficas.

O exame radiológico não apresentou alterações quanto ao índice cárdio-torácico (ICT=0,39 - 0,42). Nenhuma alteração foi visualizada no cólon e esôfago.

Anticorpos IgM totais foram detectados à partir da 3^a semana p. i., apresentando um aumento progressivo de 207,81% entre as semanas 5 e 10. Os anticorpos IgM específicos anti *T. cruzi* foram detectados entre as semanas 2 a 12 p. i.. A presença de anticorpos IgG totais foi verificada à partir da semana 0, apresentando aumento progressivo de 256,26%

entre as semanas 5 e 11 p. i.. Anticorpos IgG anti-T. cruzi foram identificados a partir da 1ª semana p.i. com pico na semanas 11 e 12 p.i..

4.1.1.2.2 Fase crônica

Na fase crônica tardia da infecção, o xenodiagnóstico apresentou resultados negativos.

Os exames eletrocardiográficos mostraram, após cerca de 16 anos de infecção, extra sístole ventricular e RVA. O ecocardiograma não revelou qualquer alteração.

Ao raio X, foram encontradas alterações no ICT (0,62), porém nenhuma alteração digestiva foi visualizada.

A detecção de anticorpos IgG específicos anti T. cruzi foi possível até o momento da eutanásia.

4.1.1.3 Macaco 95

O animal 95 nasceu em 01/12/1979 e foi infectado com $1,5 \times 10^3$ formas tripomastigotas da cepa Colombiana por quilo de peso aos 4,8 anos de idade.

4.1.1.3.1 Fase Aguda

Durante a fase aguda, houve uma perda progressiva de peso até a 9ª semana p.i. que variou em cerca de 9,04%. A presença de chagoma de inoculação foi observada a partir do 11º d. p. i., permanecendo até o dia 18 p.i., caracterizando-se por uma lesão eritematosa ovóide. Os linfonodos axilares apresentavam-se com consistência elástica e não aderentes. Não houve presença de hepatoesplenomegalia. A detecção de parasitas foi avaliada por métodos diretos e indiretos, compostos por avaliação da parasitemia, hemocultura e xenodiagnóstico. A parasitemia direta foi detectada entre a 3ª e 5ª semana pós-infecção demonstrando um pico de parasitemia de $2,5 \times 10^4$ parasitas por ml de sangue. Os parasitas foram isolados por hemocultura até a 32ª semana p.i e o xenodiagnóstico permaneceu negativo. Foram encontradas alterações eletrocardiográficas compatíveis com bloqueio

átrio-ventricular de primeiro grau (BAV I) e repolarização ventricular anormal entre a 4ª e 12ª semanas p.i.. Nesta fase, não foram realizadas avaliações ecocardiográficas.

O exame radiológico apresentou alterações quanto ao índice cárdio-torácico (ICT) do 30º ao 54º dias p.i (ICT=0,50). Nenhuma alteração foi visualizada ao exame radiológico de cólon e esôfago.

Anticorpos IgM totais foram detectados à partir da semana zero, apresentando um aumento progressivo de 427,08% entre as semanas 5 e 10. Os anticorpos IgM específicos anti T. cruzi foram detectados entre as semanas 2 a 12 p. i.. A presença de anticorpos IgG totais foi verificada à partir da semana 0, apresentando aumento progressivo de 302,24 % entre as semanas 1 e 10 p. i.. Anticorpos IgG anti-T. cruzi foram identificados a partir da 2ª semana p.i. com pico na semana 12 p.i..

4.1.1.3.2 Fase crônica

Na fase crônica tardia da infecção, o xenodiagnóstico foi positivo cerca de 16 anos p.i.. Não ocorreram alterações hematológicas significativas entre este animal e os animais controles. As alterações de fase crônica foram observadas pelas avaliações radiológica, eletrocardiográfica e ecocardiográficas. O exame radiológico cardíaco mostrou-se com ICT alterado (0,69) aos 14,7 anos p.i., porém as radiografias realizadas em cólon e esôfago permaneceram sem alterações. Os exames eletrocardiográficos mostraram, após cerca de 17 anos de infecção, bloqueio de ramo esquerdo do feixe de His (BRE) e repolarização ventricular anormal. O ecocardiograma revelou alteração no septo ventricular deste animal também aos 17 anos p.i..

A detecção de anticorpos IgG específicos anti T. cruzi foram detectados até o momento da eutanásia.

4.1.1.4 Macaco 99

O macaco 99 nasceu em 21/10/1979 e foi infectado com $1,9 \times 10^3$ formas tripomastigotas da cepa Colombiana por quilo de peso aos 4,6 anos de idade.

4.1.1.4.1 Fase aguda

Durante a fase aguda houve perda progressiva de peso até a 9ª semana p. i. que variou em cerca de 11,11%. A presença de chagoma de inoculação foi verificada dos 13 aos 19 dias p. i., composto por lesão maculosa e eritematosa. Os linfonodos axilares apresentaram-se palpáveis do 11º ao 19º dias p. i., de consistência elástica e não aderentes. Não houve presença de hepatoesplenomegalia. A detecção de parasitas foi avaliada por métodos diretos e indiretos, compostos por avaliação da parasitemia, hemocultura e xenodiagnóstico. A parasitemia direta foi detectada entre a 2ª e 7ª semanas p. i., com pico de parasitemia na 4ª semana p. i. (2×10^5 parasitas/ml de sangue). Os parasitas foram isolados por hemocultura até a 32ª semana p. i. e o xenodiagnóstico apresentou positividade da 11ª a 29ª semana p. i..

Não foram encontradas alterações eletrocardiográficas e radiológicas neste animal (ICT= 0,39 - 0,42). Nesta fase não foram realizadas avaliações ecocardiográficas.

Anticorpos IgM totais foram detectados à partir da 5ª semana p. i., apresentando um aumento de 125 % entre as semanas 5 e 8 p. i. Os anticorpos IgM específicos anti T. cruzi foram detectados entre as semanas 2 a 12 p. i.. A presença de anticorpos IgG totais foi verificada à partir da semana 0, apresentando aumento progressivo de 207,14% entre as semanas 5 e 11 p. i.. Anticorpos IgG anti-T. cruzi foram identificados a partir da 5ª semana p.i..

4.1.1.4.2 Fase crônica

Na fase crônica tardia da infecção, o xenodiagnóstico não apresentou positividade.

Não foram encontradas alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas.

Ao RX, houve um aumento do ICT (0,58), porém nenhuma alteração digestiva foi visualizada.

A detecção de anticorpos IgG específicos anti *T. cruzi* foi possível até cerca de 16 anos p.i.. No entanto, as análises sorológicas realizadas com as amostras de sangue coletadas no momento da eutanásia revelaram a negatificação da parasitemia, confirmada pela realização do teste de imunofluorescência.

4.1.1.5 Macaco 103

O animal 103 nasceu em 13/11/1979 e foi infectado com $1,7 \times 10^3$ formas tripomastigotas da cepa Colombiana por quilo de peso aos 4,7 anos de idade.

4.1.1.5.1 Fase aguda

Durante a fase aguda houve perda progressiva de peso até a 9ª semana p. i. que variou em cerca de 4,12%. A presença de chagoma de inoculação foi observada dos 13 aos 19 dias p.i., composto por mácula eritematosa de 4,5 cm de diâmetro. Os linfonodos axilares apresentaram-se palpáveis, com 2 cm de diâmetro e não aderentes, dos 13 aos 19 dias p. i. Não houve presença de hepatoesplenomegalia. A detecção de parasitas foi avaliada por métodos diretos e indiretos, compostos por avaliação da parasitemia, hemocultura e xenodiagnóstico. A parasitemia direta foi detectada entre a 2ª e 7ª semanas p. i., com pico de parasitemia na 5ª semana p. i. ($2,5 \times 10^5$ parasitas/ml de sangue). Os parasitas foram isolados por hemocultura e xenodiagnóstico à partir da 1ª semana p. i..

Foram encontradas alterações eletrocardiográficas entre a 6ª e 8ª semanas p. i., compatíveis com BAV-I e RVA. Nesta fase não foram realizadas avaliações ecocardiográficas.

O exame radiológico não apresentou alterações quanto ao ICT (0,39 - 0,42). Nenhuma alteração foi visualizada no cólon e esôfago.

Anticorpos IgM totais foram detectados entre a 3ª e 21ª semanas p.i. apresentando um aumento progressivo de 289,18% entre as semanas 6 e 11 e os anticorpos IgM específicos anti *T. cruzi* foram detectados entre a 5ª e 12ª semana p. i..

A presença de anticorpos IgG totais foi verificada à partir da semana 0, apresentando aumento progressivo de 174,02 % entre as semanas 2 e 8 p. i.. Anticorpos IgG anti-*T. cruzi* foram identificados a partir da 5ª semana p.i. com pico na semanas 11 e 12 p.i..

4.1.1.5.2 Fase crônica

Na fase crônica tardia da infecção, o xenodiagnóstico e a hemocultura foram positivos até cerca de 16 anos p. i..

Foram encontradas alterações eletrocardiográficas e radiológicas. O ECG continuou revelando BAV-I e RVA, porém também revelou taquicardia sinusal. O exame radiológico cardíaco demonstrou aumento do ICT (0,71). Contudo, nenhuma alteração digestiva foi visualizada. O ecocardiograma não revelou qualquer alteração.

A detecção de anticorpos IgG específicos anti *T. cruzi* foi possível até cerca de 20 anos p.i. até a eutanásia

Os resultados obtidos através do eritrograma revelaram uma anemia normocítica e normocrômica, entre a 3ª e 7ª semana p.i. em todos os animais infectados. O leucograma revelou leucocitose por linfocitose entre a 8ª e 18ª semanas p.i.. principalmente pelo aumento do número de linfócitos T CD4 e CD8 em relação ao animais controles.

4.1.1.6 Macacos 81 e 94

O animal 81 nasceu em 28/10/1979 e o animal 94 em 26/11/1978. Estes dois animais foram utilizados como controle experimental. Por todos os anos do experimento, receberam as mesmas condições de alojamento e alimentação que os animais infectados. Durante o acompanhamento da fase aguda da infecção, estes animais não apresentaram perda progressiva de peso. Os linfonodos axilares apresentaram-se normais quanto a consistência, elasticidade e aderência. O hemograma completo não revelou qualquer alteração. Nenhuma alteração eletrocardiográfica, radiológica ou ecocardiográfica foi observada nestes animais. Não foram detectados anticorpos específicos anti *T. cruzi* (IgM e IgG).

4.2 Estudos *Post mortem*

4.2.1 Avaliação estereológica

Foram feitas análises estereológicas quanto à densidade de volume de cardiomiócitos ($V_v\text{ cmy}$ em %), densidade de volume de vasos ($V_v\text{ ve}$ em %), densidade de volume de tecido conjuntivo ($V_v\text{ ct}$ em %), comprimento dos vasos ($L_v\text{ ve}$ em mm/mm³) e área de cardiomiócitos ($A\text{ cmy}$ em μm^2) em átrio esquerdo (AE), ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) dos animais infectados e controles. Infelizmente não foi possível analisar o animal 90 por ter apresentado lesões microscópicas típicas de alterações *post mortem*. Da mesma forma não obtivemos material suficiente de AE do animal 94 (controle) para estas análises. Somente foi evidenciado um aumento estatisticamente significativo da densidade de volume de vasos ($V_v\text{ ve}$ em %) em VD nos animais infectados quando comparados aos controles sadios ($3,7\pm 0,1\%$; $1,6\pm 0,5\%$ respectivamente; $p = 0,03$), podendo refletir um aumento na angiogênese em VD nos animais infectados. Contudo, alguns parâmetros como a densidade de volume de tecido conjuntivo ($V_v\text{ ct}$) estava 1,56 vezes maior nos animais infectados em comparação aos animais controles; da mesma forma em relação ao comprimento dos vasos ($L_v\text{ ve}$; 2,3 vezes em VD e 2,4 vezes em VE), corroborando com a possibilidade de se ter uma maior densidade de volume de vasos (Tabela 6).

Tabela 6: Avaliação estereológica do tecido cardíaco de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) na fase crônica tardia da Doença de Chagas experimental: Densidade de volume de cardiomiócitos, tecido conjuntivo e vasos, comprimento dos vasos e área de cardiomiócitos

	Vv cmy (%) ^a			Vv ct (%) ^b			Vv ve (%) ^c			Lv ve (mm/mm ³) ^d			A cmy (μm ²) ^e		
	AE	VD	VE	AE	VD	VE	AE	VD	VE	AE	VD	VE	AE	VD	VE
Infectados															
64	88,7	78,3	76,3	10,5	18,1	20,8	0,8	3,6	2,9	150,8	465,1	414,8	910,14	788,73	912,99
95	84,4	85,4	89,4	12,7	11,7	7,4	2,9	2,9	3,2	414,8	271,5	452,5	714,46	381,78	448,79
99	85,3	82	90,3	13,1	13,2	7	1,5	4,8	2,7	301,7	515,3	603,3	592,98	836,62	951,32
103	79,9	77,9	83,2	19,3	18,6	13,4	0,8	3,5	3,4	553	1068,4	754,1	655,66	750,8	678,74
Média ± DP	84,6 ± 0,4	80,9 ± 0,4	84,8 ± 0,6	13,9 ± 0,4	15,4 ± 0,3	12,2 ± 0,6	1,5 ± 0,1	3,7 ± 0,1	3,0 ± 0	355,1 ± 170,6	580,1 ± 342,1	556,2 ± 155,1	947,6 ± 526,3	938,3 ± 584,9	1227 ± 1,09
Controles															
81	89,7	85,1	88,3	8,9	13,7	11	1,5	1,2	0,6	289,1	238,8	163,4	762,93	720,34	1011,37
94	–	89,5	90,7	–	8,6	6,2	–	1,9	3,2	–	268,7	490,2	–	586,04	833,9
Média ± DP	89,7	87,3 ± 3,1	89,5 ± 1,6	8,9	11,1 ± 3,6	8,6 ± 3,4	1,5	1,6 ± 0,5	1,9 ± 1,8	289,1	253,7 ± 21,1	231,1 ± 0,21	762,93	653,2 ± 95,0	922,6 ± 125,5
teste t	0,23	0,1	0,39	0,24	0,23	0,52	0,19	0,03	0,23	0,22	0,27	0,21	0,29	0,54	0,72

Tecido cardíaco compreende átrio esquerdo (AE), ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE)

a Densidade de volume de cardiomiócitos; **b** Densidade de volume do tecido conjuntivo, **c** Densidade de volume de vasos, **d** Comprimento dos vasos, **e** Área de cardiomiócitos

4.2.2 Análise Histopatológica e morfométrica

4.2.2.1 Análise do Infiltrado inflamatório

Ao avaliarmos o número de células inflamatórias presentes no tecido cardíaco (átrio esquerdo -AE, ventrículo direito - VD e ventrículo esquerdo - VE) dos animais infectados, observamos diferentes perfis no padrão de distribuição do processo inflamatório (Tabela 7), representado pelo acúmulo de células inflamatórias. Assim, o VE foi o compartimento cardíaco onde o maior número de células inflamatórias foi identificado entre os animais infectados, apresentando $14,5 \pm 8,1$ (média \pm erro padrão) células por campo (média de células por 32 campos escolhidos aleatoriamente), seguido pelo AE ($2,8 \pm 1,95$) e VD ($2,0 \pm 1,0$), enquanto que nos animais controle poucas células foram identificadas ($0,3 \pm 0,28$; $1,1$ e $0,4 \pm 0,14$ respectivamente). Contudo, ao analisarmos os animais infectados individualmente foi possível notar que o **animal 64** (Figura 3, Tabela 7) apresentou um maior número médio de células inflamatórias por campo em todos os compartimentos cardíacos (VE, 44,9; AE, 10,3; VD, 6,2 média de células; sendo estas 150; 9,4 e 15,5 vezes maior que os animais controle respectivamente). Além disso, não houve associação com as alterações elétricas e/ou miocárdicas, visto que este animal não apresentou tais alterações na fase crônica tardia Anexo 1). Em relação aos **animais 103 e 95** (Figura 4 e 5 respectivamente), que apresentaram focos inflamatórios somente em VE (com aumento de 53 e 36 vezes maior que os animais controles), observamos que estes animais demonstraram comprometimento cardíaco compatível com a fase crônica da doença de Chagas (Bloqueio átrio-ventricular grau 1 -BAV 1⁰ e bloqueio de ramo direito do feixe de his grau 1 - BRD 1⁰ para o animal 103 e bloqueio do ramo esquerdo do feixe de his grau 2 - BRE 2⁰ grau, repolarização ventricular anormal - RVA e alterações ecocardiográficas) (Anexos 1 e 2) e índice cárdio-torácico alterado (Anexo 1). O **animal 90** (Figura 6 e Tabela 7) apesar de apresentar comprometimento cardíaco compatíveis com a doença de Chagas crônica (BRE 1⁰ grau, extrasístoles atriais e ventriculares e RVA), este animal não apresentou focos inflamatórios em nenhum compartimento cardíaco avaliado. De modo interessante, o **animal 99** (Figura 7) se comportou como os animais sadios, não

apresentando focos inflamatórios em nenhum dos compartimentos cardíacos, possivelmente associados a negatificação da sorologia e ausência de alterações cardíacas no momento da necropsia. O histórico deste animal mostra que a infecção foi branda e assintomática durante todo o curso da doença (Anexo 1). Apesar desta amostra ser muito reduzida, foi possível verificar claramente a dissociação entre a presença do processo inflamatório e alterações clínicas cardíacas.

A análise histopatológica mostrou que em nenhum dos cortes foram observados elementos parasitários típicos (formas amastigotas) na coloração por HE. Todos os animais, com exceção do animal 99 e dos animais controle, apresentaram hipertrofia miocárdica multifocal com deposição de lipofuccina, caracterizando dano de fibra. Em especial no animal 95 notou-se uma área focal de necrose de liquefação em átrio esquerdo desprovida de infiltrado inflamatório (dado não mostrado).

A degeneração vacuolar esteve presente em todos os animais infectados sob graus variados e de difícil quantificação por serem de caráter multifocal e muitas vezes isolados em um pequeno número de células miocárdicas.

Os animais controle 81 e 94 (Figuras 8 e 9, respectivamente e Tabela 7) exibiram um endocárdio de aspecto usual. O miocárdio apresentou-se composto por fibras de espessura habitual, desprovido de sinais de inflamação, necrose e de elementos parasitários típicos na coloração por H. E.

Tabela 7: Análise da presença de células inflamatórias no tecido cardíaco de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) na fase crônica tardia da Doença de Chagas experimental: número de células inflamatórias por campo histológico, distribuídas nos compartimentos cardíacos.

	AE	VD	VE
Infectados	n° células/campo*		
64	10,3	6,2	44,9
90	0,9	2,0	1,0
95	1,1	1,3	10,7
99	1,1	0,0	0,2
103	0,5	0,7	15,8
<i>média</i>	2,8	2,0	14,5
<i>SD</i>	4,2	2,4	18,2
<i>EP</i>	1,9	1,0	8,1
Controles			
81	1,1	0,3	0,6
94	–	0,6	0,0
<i>média</i>	1,1	0,4	0,3
<i>SD</i>	–	0,2	0,4
<i>EP</i>	–	0,14	0,28

* Média do número de células inflamatórias analisadas em 32 campos

SD – desvio padrão

EP – Erro padrão

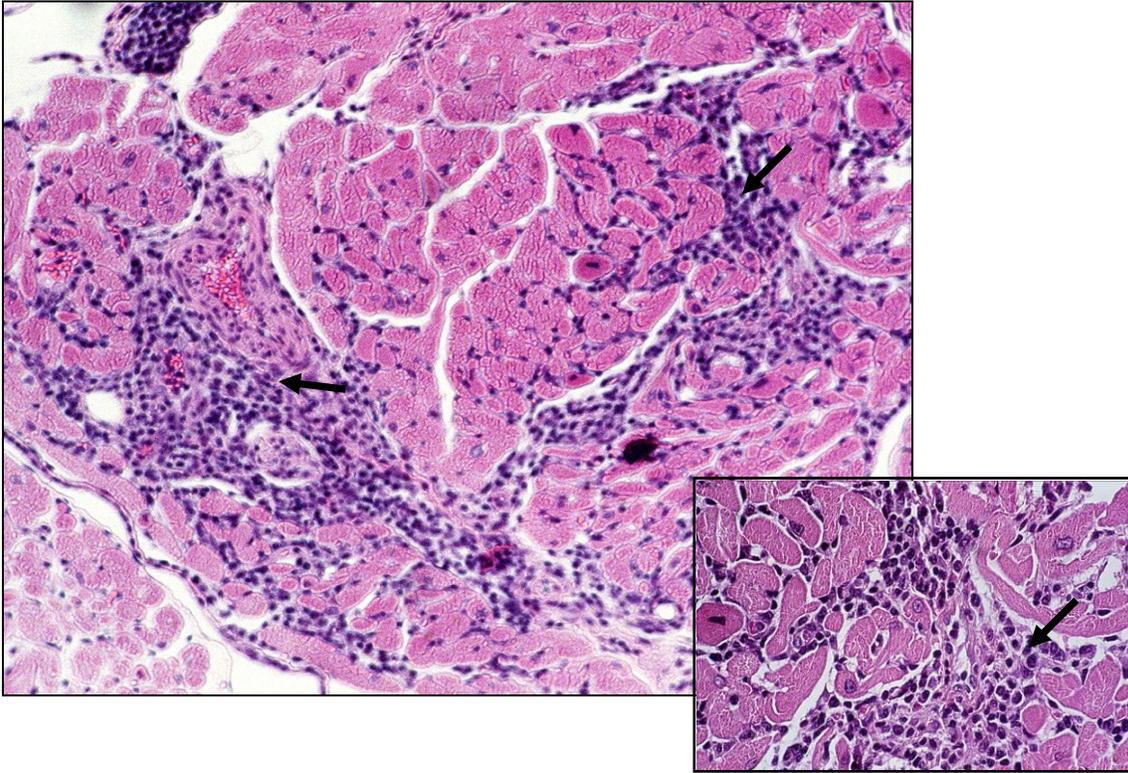


Figura 3 - Infiltrado inflamatório: Corte histológico do ventrículo esquerdo do animal 64 infectado experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi* demonstrado pela coloração HE (10X). Detalhe em maior aumento (40X). Setas indicam infiltrados inflamatórios.

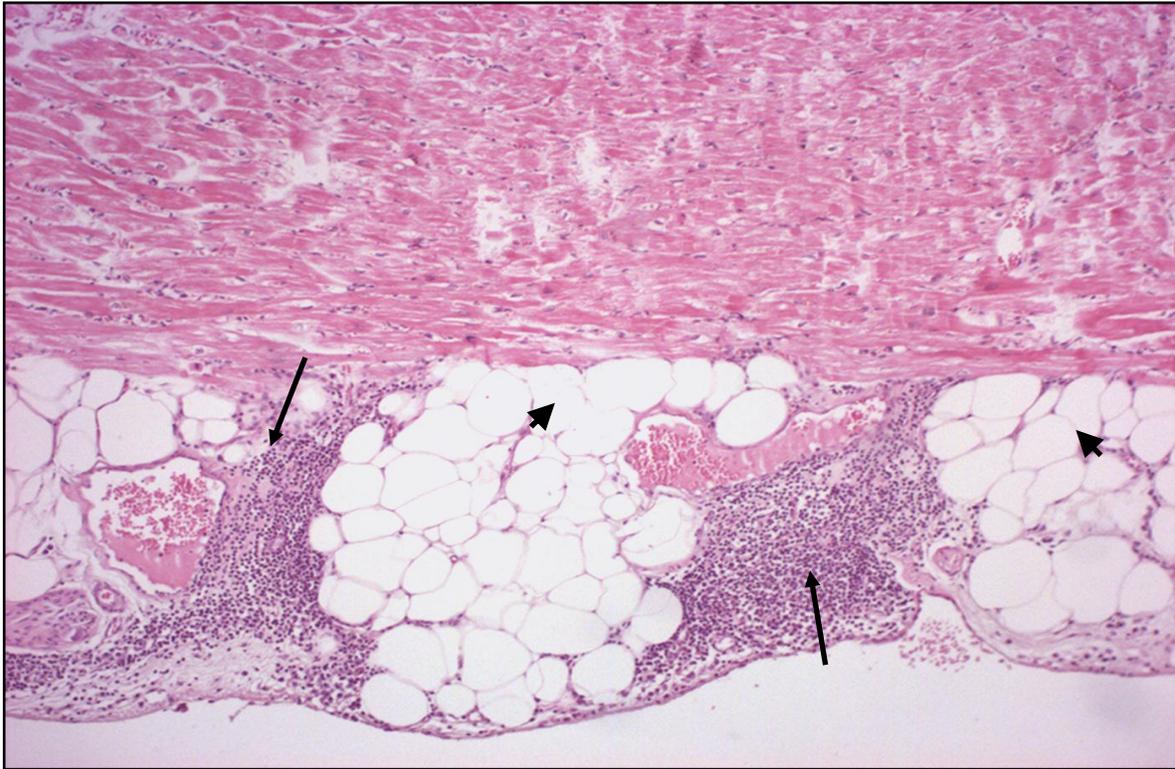


Figura 4 - Infiltrado inflamatório – Corte histológico do ventrículo esquerdo do animal 103 infectado experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi* demonstrado pela coloração HE (10X): epicardite multifocal (seta) permeando adipócitos (cabeça de seta).

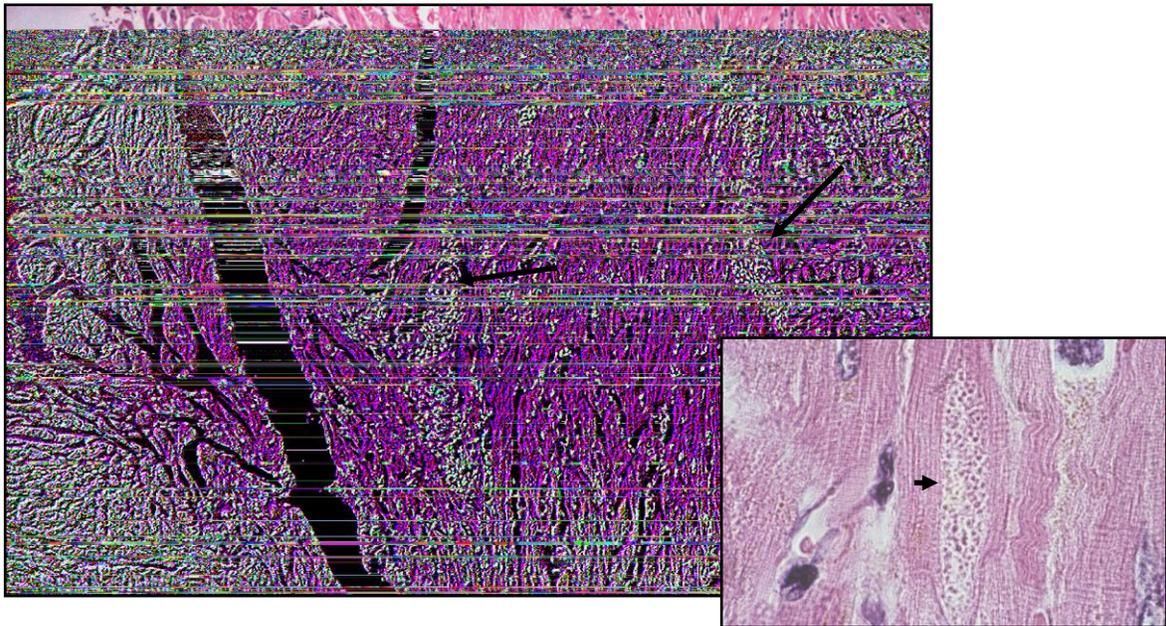


Figura 5 - Infiltrado inflamatório: Corte histológico do ventrículo esquerdo do animal 95 infectado experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi* demonstrando infiltrado inflamatório (seta) pela coloração HE (10X); Detalhe evidenciando depósito de lipofuscina (ponta da seta) em cardiomiócitos (40X).

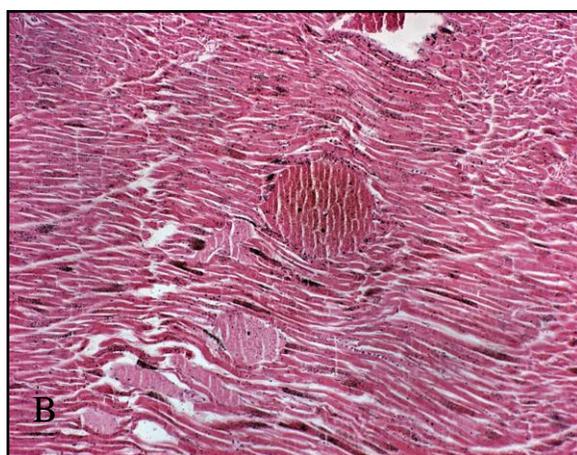
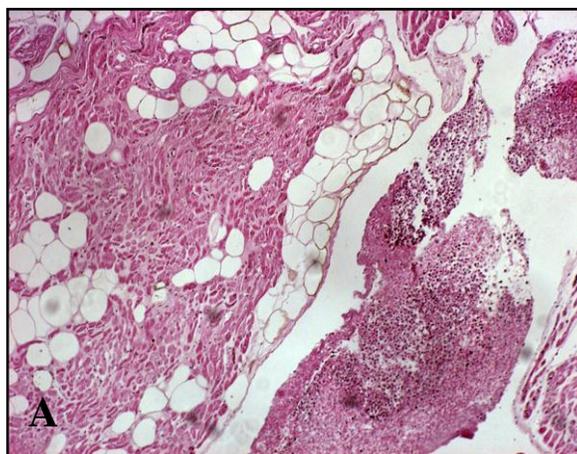


Figura 6 - Tecido cardíaco – Cortes histológicos corados com HE demonstrando o tecido cardíaco do animal 90 (Infectado): A:Ventrículo direito (10X); B: ventrículo esquerdo (10X); C: átrio esquerdo (10X) . Como este animal apresentou artefatos teciduais pré analíticos decorrentes de fixação e presença de congestão vascular decorrente de efeitos de morte, não foi possível avaliar a deposição de fibrose pela coloração de Tricômio de Masson.

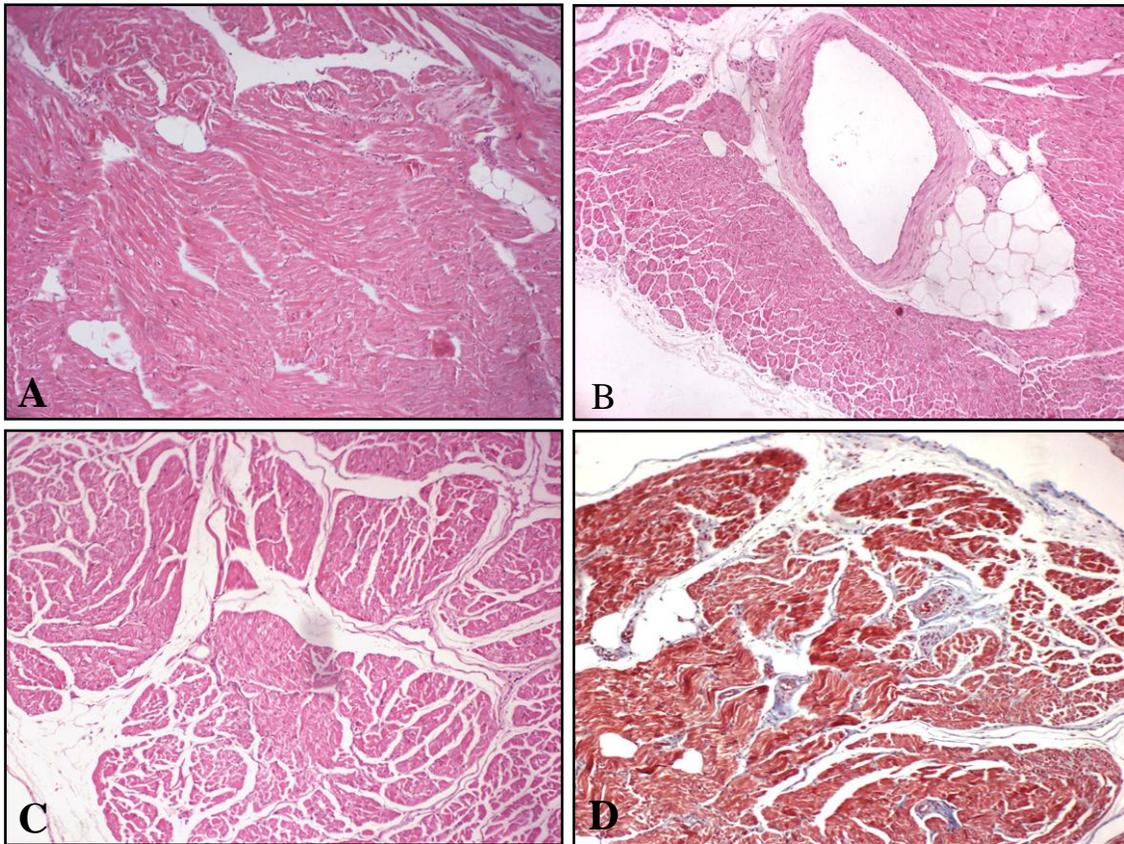


Figura 7 - Tecido cardíaco – Cortes histológicos corados com HE demonstrando o tecido cardíaco do animal 99 (infectado): Ventrículo direito (A), ventrículo esquerdo (B) e átrio esquerdo (C). D: átrio esquerdo corado com Tricômio de Masson para demonstração da deposição normal de fibras colágenas (10X).

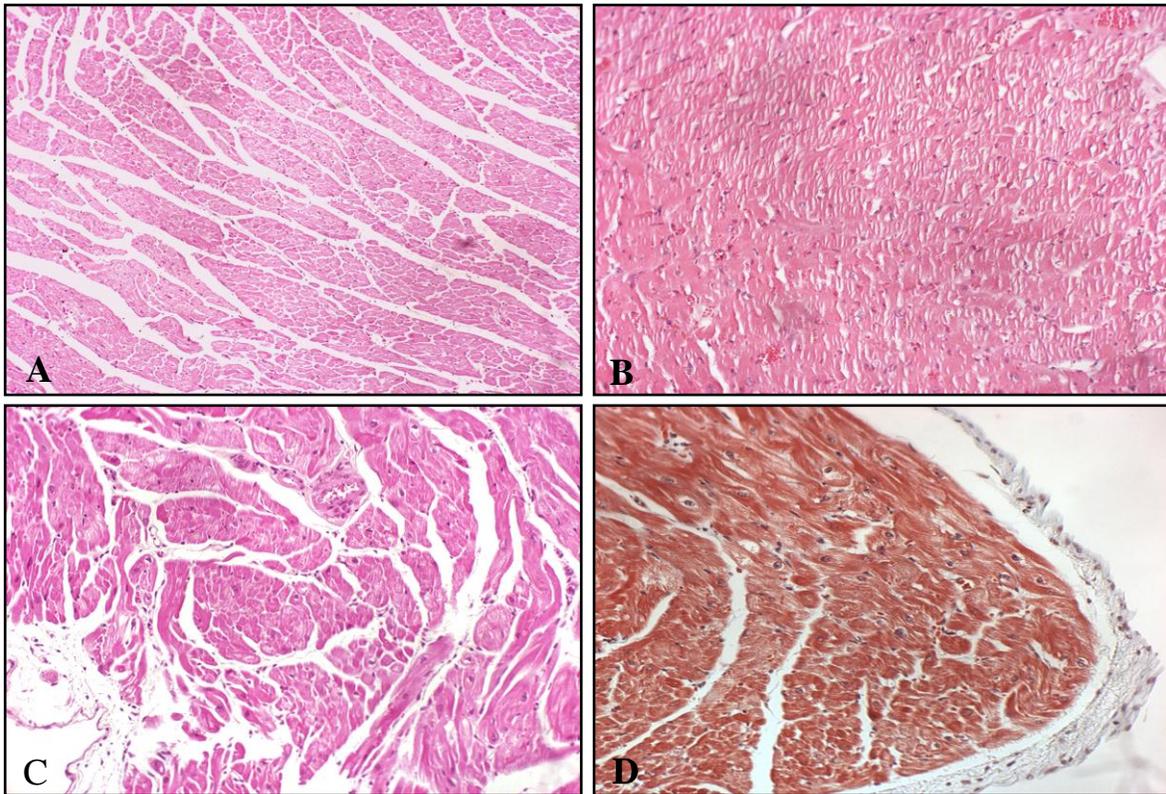


Figura 8 - Tecido cardíaco – Cortes histológicos corados com HE demonstrando o tecido cardíaco do animal 81 (controle): A:Ventrículo direito (10X); B: ventrículo esquerdo (20X); C: átrio esquerdo (20X); D: átrio esquerdo corado com Tricômio de Masson, para evidenciar o padrão de distribuição de fibras colágenas no animal não-infectado. (10X).

4.2.2.2 Fibrose

Foram quantificadas as áreas de fibrose tecidual em átrio esquerdo e em ventrículos direito e esquerdo, corados com Tricômio de Masson, dos animais infectados e controles através do uso do software Image Pro Plus versão 4.5. Excluímos a análise do átrio direito dos animais infectados, pois somente conseguimos amostras de apenas dois animais (95 e 103). Dez campos escolhidos aleatoriamente de cada compartimento foram observados em microscopia óptica (aumento de 20x) e quantificados quanto a sua área total e a área de fibrose e os valores expressos em μm^2 . A proporção de fibrose encontrada em relação à área total avaliada foi expressa em porcentagem.

Conforme mostra a Tabela 8, observamos que a fibrose estava presente em todos os animais infectados, com exceção do animal 95. Para que pudéssemos descartar que este processo degenerativo das fibras cardíacas não estivesse presente também no átrio direito do **animal 95**, este compartimento foi também analisado e verificamos uma extensa área fibrótica (dados não mostrados – Figura 12). Este foi o animal com maior comprometimento cardíaco demonstrado pelos exames eletrocardiográficos e ecocardiográficos (Tabela 4) e apresentando um infiltrado inflamatório considerado de moderado a leve.

O padrão de distribuição da fibrose foi caracterizado como sendo multifocal nos ventrículos e difuso no átrio esquerdo, acometendo exclusivamente o miocárdio. Assim, a quantificação da fibrose revelou um maior acometimento em átrio esquerdo em 3 de 4 animais infectados do que nos demais compartimentos, com exceção do **animal 103** que apresentou maior acometimento em VE (17,6 % de área cardíaca acometida; Tabela 8). O **animal 64** (Figura 11) manteve, como descrito para a presença de foco inflamatório, o maior comprometimento em AE (7,1 % de área acometida), contudo não evidenciamos presença de fibrose neste animal em VD e VE (0 e 0,9% de área acometida, respectivamente). Os animais 90 e 99 apresentaram respectivamente 2,1 e 3,8% de área acometida em AE, sendo 21 e 38 vezes maiores que o animal controle (0,1% - Tabela 8).

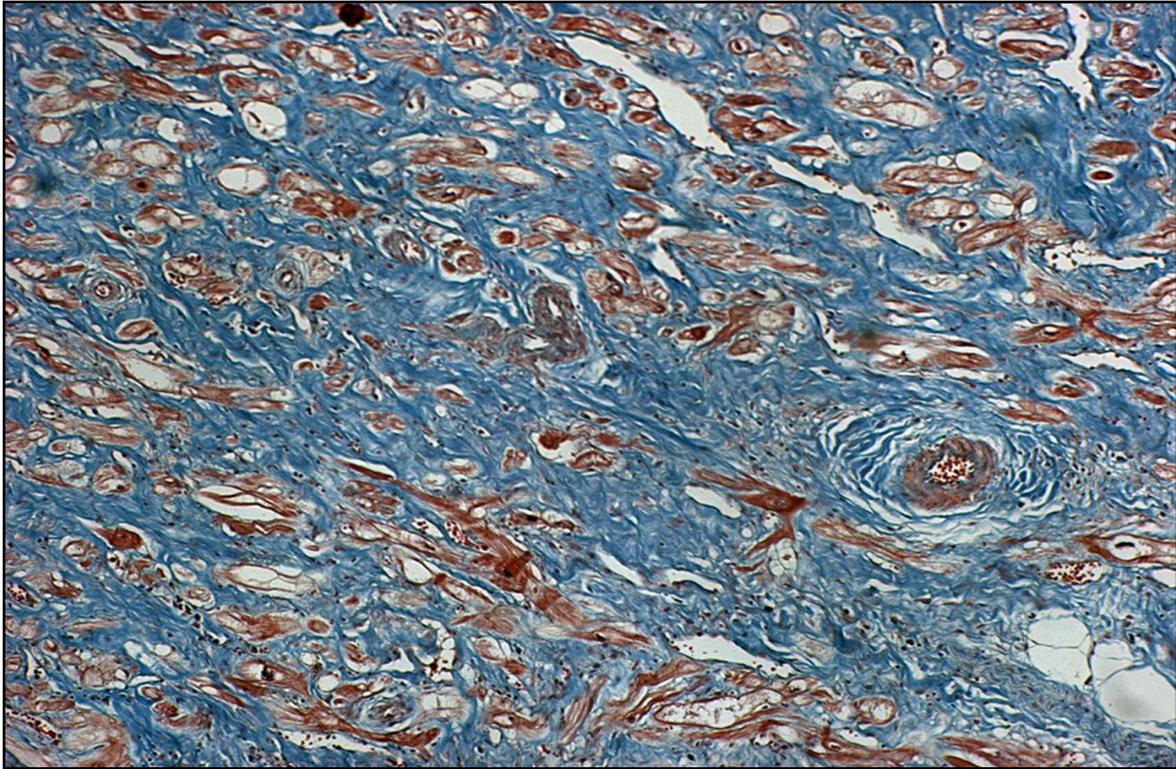


Figura 10 – Fibrose: Corte histológico do átrio direito do animal 95 infectado experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi*, demonstrando extensa fibrose, demonstrada pela coloração de Tricômio de Masson (10X).

Tabela 8: Avaliação histopatológica do tecido cardíaco de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) na fase crônica tardia da Doença de Chagas: Porcentagem de fibrose distribuída nos compartimentos cardíacos dos animais infectados e controles.

	AE	VD	VE
Infectados	Porcentagem		
64	7,1	0,0	0,9
90	2,1	0,0	1,2
95	0,0	0,0	0,0
99	3,8	0,0	0,0
103	6,5	2,2	17,6
<i>média</i>	3,9	0,4	3,9
<i>SD</i>	2,7	0,9	6,8
<i>EP</i>	0,1	0,0	0,3
Controles			
81	0,1	2,8	0,0
94	–	0,0	0,1
<i>média</i>	–	1,4	0,1
<i>SD</i>	–	2,0	0,1
<i>EP</i>	–	1,4	0,1

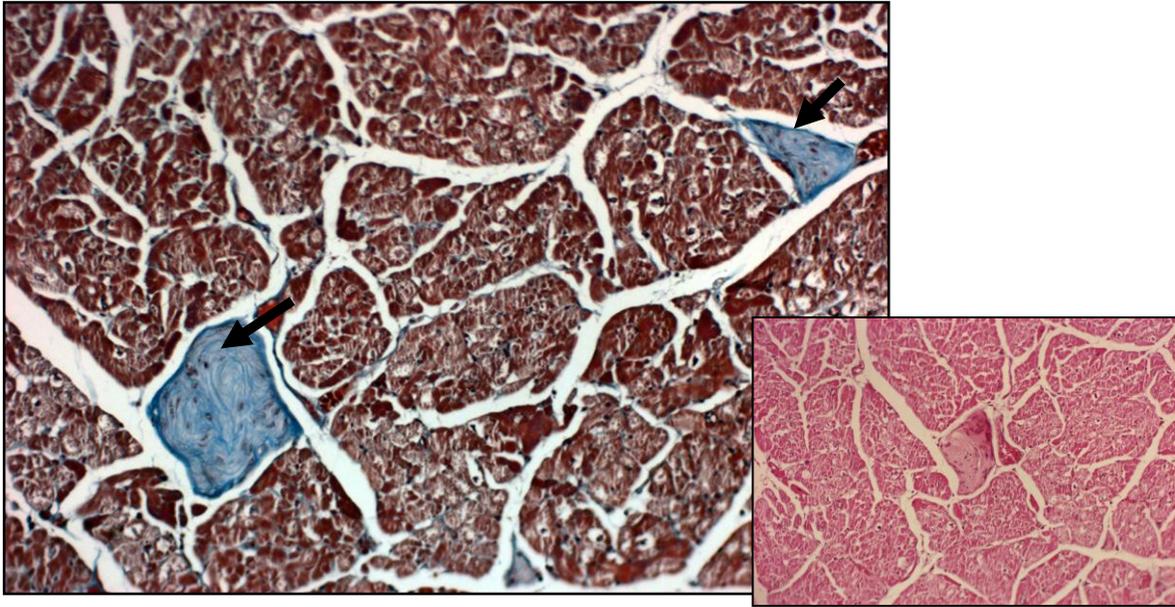


Figura 11– Fibrose: Corte histológico do átrio esquerdo do animal 64 infectado experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi*, demonstrada pela coloração de Tricômio de Masson (20X). Detalhe no mesmo aumento da lesão visualizada na coloração HE.

4.2.2 Avaliação da presença de citocinas e iNOS em VE

Como foi demonstrado que o VE foi o compartimento cardíaco que mais apresentou focos inflamatórios em todos os animais infectados, optamos por avaliar esta área cardíaca quanto a presença de citocinas (IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-12), da molécula de superfície CD68 (marcador sugestivo de macrófagos) e iNOS através da técnica de imunohistoquímica em cortes criopreservados. Para esta análise tínhamos disponíveis fragmentos de VE dos animais infectados 64 (Figura 12), 95 (Figura 13), 99 e os animais controle. Como a quantidade de células positivas nos animais controle e no animal 99 foram consideradas pequenas comparadas aos animais infectados, não mostramos os cortes corados destes animais.

Para analisarmos o número de células expressando cada uma das citocinas, iNOS e CD68, o corte foi analisado em pelo menos 50 campos em aumento de 200 vezes e o número médio de células presentes em VE descrito na Tabela 9.

Foi possível identificar que as células que demonstraram marcação para IFN- γ estavam dispostas em meio a infiltrados inflamatórios e estavam presentes nos animais infectados, exceto no animal 99. O número de células em 50 campos expressando IFN- γ foi de 11 e 1 (animais 64 e 95 respectivamente). Estes números parecem relativamente baixos, mas nenhuma marcação foi observada nos dois animais controles.

A expressão de IL-4 em VE foi identificada apenas no miocárdio dos animais 64 e 95 (4 e 1 células, respectivamente). Nenhuma marcação foi observada mais uma vez nos dois animais controles e no animal 99.

A expressão de IL-10 esteve presente apenas no animal 64 (5 células marcadas). Da mesma forma, a presença de IL-12 foi evidenciada somente no animal 95 (5 células marcadas).

Ao avaliarmos a expressão da molécula CD68 nos cortes histológicos de ventrículo esquerdo, observamos positividade em todos os animais infectados e todas as marcações restritas a focos inflamatórios de menor ou maior grau (Figuras 12 e 13). A expressão de iNOS pareceu estar associada a presença de infiltrado inflamatório e comumente encontrada em regiões perivasculares nos animais 64, 95 e 99 infectados (média \pm EP: 79 \pm 46; controles: 6 \pm 5). Os animais controle demonstraram marcação focal e dispersa no

tecido, não estando associada a células inflamatórias. Nos parece possível que as marcações que não foram encontradas em células inflamatórias possam representar uma ativação da iNOS por cardiomiócitos ou fibroblastos.

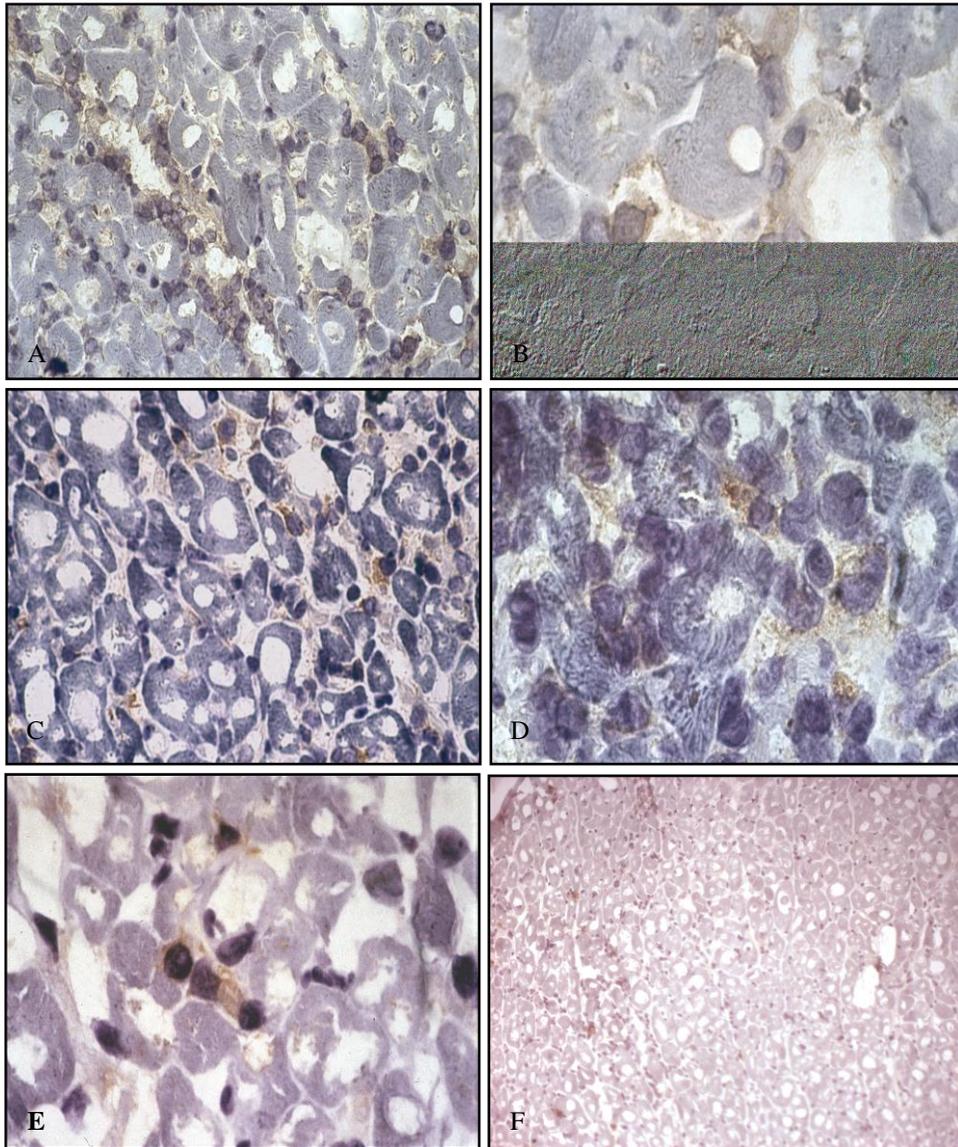


Figura 12 : Imunohistoquímica de cortes criopreservados de ventrículo esquerdo do animal 64. A: IFN γ (40 X); B: IFN γ (100 X); C: iNOS (40 X); D: iNOS (100 X); E: IL-4 (40 X); F: IL-4 (100 X); G: IL-10 (100 X); H: controle negativo (20X).

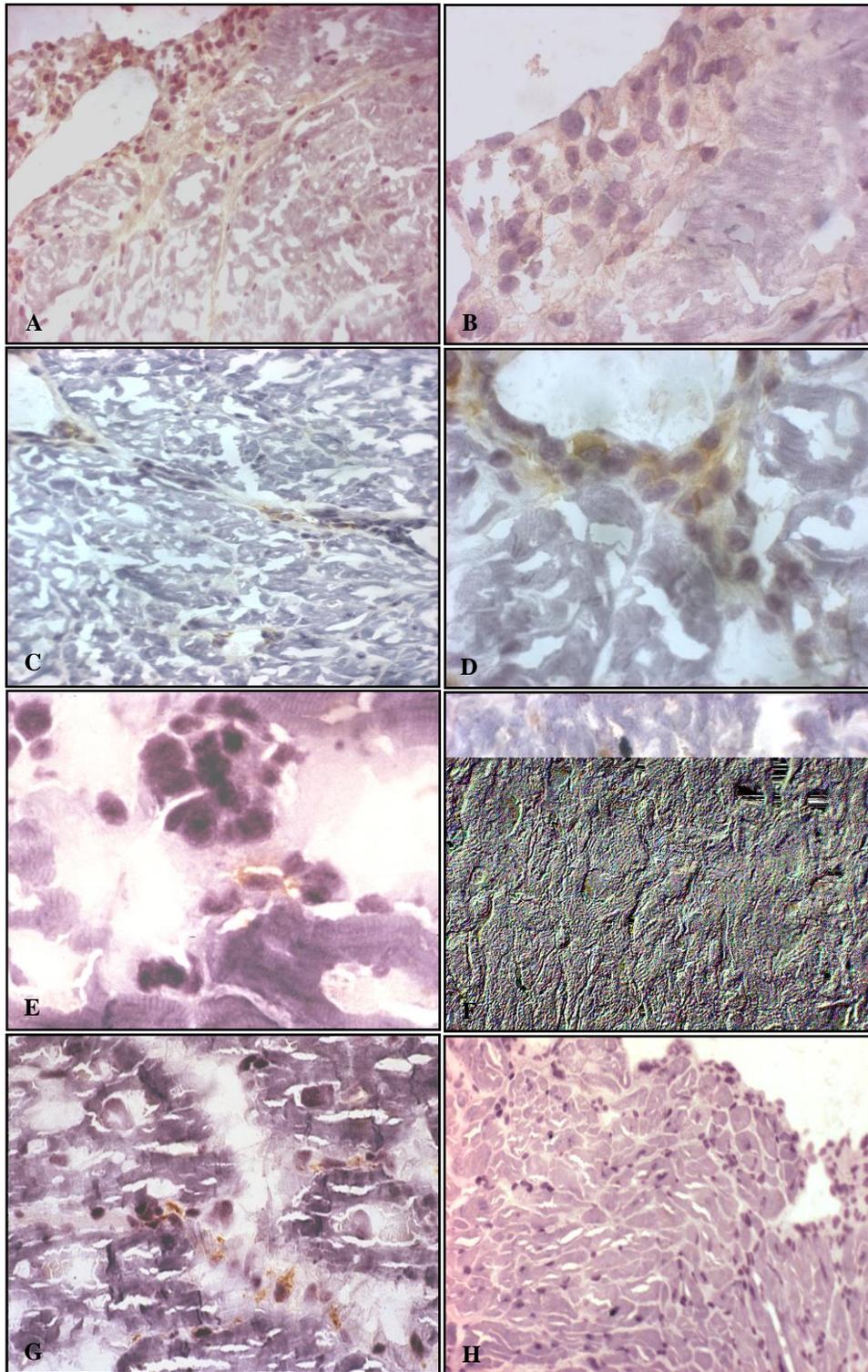


Figura 13: Imunohistoquímica de cortes criopreservados de ventrículo esquerdo do animal 95 - A: IFN γ (40 X); B: IFN γ (100 X); C: iNOS (40 X); D: iNOS (100 X); E: IL-4 (100 X); F: IL-12 (40 X); G: CD68 (40 X); H: controle negativo (20X).

Tabela 9: Avaliação da expressão da iNOS e citocinas em ventrículo esquerdo de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) na fase crônica tardia da doença de Chagas.

Infectados	número de células/50 campos					
	IL-4	IL-10	IL-12	CD68	IFN	iNOS
64	4	5	0	52	11	173
95	1	0	5	70	1	44
99	0	0	0	12	0	21
Média	2	2	2	45	4	79
EP	1,73	1,73	1,73	17,3	3,46	46
Controles						
81	0	0	1	5	0	1
94	0	0	0	20	0	11
Média	0	0	0	13	0	6
EP	–	–	–	7,8	0	5

4.2.3 Diagnóstico clínico e histopatológico

A classificação clínica, realizada através da somatória do *score* obtido através dos exames radiológicos, eletrocardiográficos e ecocardiográficos, juntamente com as avaliações da extensão da fibrose e do número de células inflamatórias revelou que os animais 64 e 103 foram considerados como mais graves. Com infecção moderada julgada pelo mesmo sistema, encontram-se os animais 95 e 90. O animal considerado com infecção leve foi o animal 99 (Tabela 10).

Tabela 10: Classificação clínica e histopatológica através do sistema de score

Animais	Classificação				
	Clínica ¹	Score	Histopatológica ²		Score Final
			Inflamação	Fibrose	
64	A	1	3	2	6
90	A	1	1	2	4
95	B1	2	2	1	5
99	Assintomático	0	1	1	2
103	A	1	2	3	6

1 - Classificação sugerida pelo consenso brasileiro em Doença de Chagas

2- descrito em Materiais e métodos no ítem 3.11

5 DISCUSSÃO

A doença de Chagas possui, mesmo após um século de sua descoberta, muitas lacunas a serem desvendadas quanto à patogenia e desenvolvimento da forma crônica cardíaca. Assim, várias hipóteses têm sido postuladas quanto aos possíveis mecanismos de indução da cardite chagásica. Dentre elas estão os mecanismos envolvidos numa possível indução de autoimunidade, sustentada por alguns pesquisadores, onde a escassez de parasitas presentes nas lesões não se correlacionaria com a intensidade do infiltrado inflamatório e com isso geraria respostas imunes contra antígenos próprios cardíacos (Girones & Fresno, 2003; Leon & Engman, 2001; Cunha-Neto et al., 1995); a indução de uma resposta imune celular resultando na cardiopatia chagásica crônica (Tarleton, 2003); e às alterações na microvasculatura como atuantes nos processos de lesão cardíaca (Higuchi, 2006; Plentz et al., 2006). Apesar de serem reportados diversos mecanismos que possam estar envolvidos na progressão da cardiopatia chagásica crônica, ainda não existem ferramentas clínicas efetivas que possam auxiliar no estabelecimento de fatores da progressão da doença para identificar nos pacientes crônicos os que evoluirão para uma doença cardíaca e/ou digestiva grave. Desta maneira, a doença de Chagas ainda constitui um dos maiores problemas de saúde pública entre os casos de insuficiência cardíaca em áreas endêmicas, mantendo os serviços de saúde pública em alerta na busca de meios estratégicos de identificação precoce de indivíduos infectados e conter a disseminação da doença (Braga et al, 2006).

Tendo em vista que os modelos experimentais têm sido de grande valia para se conhecer os mecanismos envolvidos na cardiopatia chagásica, nos propusemos a estudar em primatas não-humanos infectados experimentalmente com cepa cardiotrópica do *T. cruzi* (cepa Colombiana), um modelo para a doença humana, (Muniz et al., 1970, Seah et al., 1974; Miles et al. 1979; Bonecini-Almeida et al. 1990; Meirelles et al., 1990; Bonecini-Almeida, 1991; Carvalho et al., 2003). Nosso grupo avaliou clinicamente macacos rhesus experimentalmente infectados pelo *T. cruzi* durante cerca de 25 anos, da fase aguda a fase crônica cardíaca. Desta forma, conduzimos o presente estudo no intuito de descrever as alterações cardíacas, vistas através de alterações eletrocardiográficas, ecocardiográficas, histopatológicas e imunológicas; bem como associar tais achados à evolução clínica de

cada animal, desde a fase aguda à fase crônica. Apesar de nossa casuística ser composta de cinco animais infectados e dois animais controle, estes se apresentaram com distintos quadros clínicos compatíveis com a doença humana que vão desde a cura espontânea (animal 99) até a cardiopatia chagásica crônica diagnosticada pelas alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas (animal 95). Para tanto, um extenso levantamento clínico longitudinal foi realizado para caracterizar a fase em que cada animal se apresentava no momento em que foram eutanasiados. Neste contexto, classificamos clinicamente os animais de acordo com a Classificação da Insuficiência Cardíaca pela ACC/AHA recomendada pelo Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (Ministério da Saúde, 2005; Xavier, et al., 2005; Siciliano, et al. 2006).

Todos os animais apresentaram sinais característicos de fase aguda (parasitemia patente, chagoma de inoculação, febre, perda de peso), contudo com ponderações em relação à gravidade variando de animal para animal. A fase crônica indeterminada apresentou-se, como na doença humana: longa (cerca de 20 anos) e sem sinais aparentes de adoecimento (Laranja et al., 1956). A fase crônica cardíaca foi evidenciada em 4 animais, mostrando mais uma vez a semelhança entre a evolução do quadro cardíaco em pacientes chagásicos e o modelo em macacos rhesus.

De modo interessante um animal (animal 99) apresentou cura parasitológica e sorológica após 20 anos de infecção. Durante a fase aguda, sinais da doença (lesão de porta de entrada, febre e pico de parasitemia) foram identificados, porém mais brandos em relação aos demais animais infectados, culminando na negativação da parasitemia direta a partir da 10^a semana. Aliados a estes dados, anticorpos IgG anti-T. cruzi que estavam presentes por 16 anos, não mais foram encontrados, negativando a sorologia até a eutanásia, num período que compreendeu cerca de 24 meses. Mesmo com a utilização de métodos moleculares para identificar a presença de kDNA do T. cruzi em amostras de sangue e posteriormente em diversos tecidos (Carvalho, 2006), estes testes mostraram-se persistentemente negativos. Segundo o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, casos de cura espontânea ocorrem após a negativação sorológica, considerada como o único método tradutor de cura. Casos de cura espontânea em pacientes são descritos na literatura como sendo excepcionais, mas mesmo assim, em algum momento da infecção há a presença de alterações cardíacas ainda que leves (Zeledón et. al, 1988; Francolino, et. al.,

2003), o que não foi evidenciado no animal 99 em nenhuma fase da doença. O conjunto de dados clínicos, sorológicos e parasitológicos indica que o animal 99 apresentou cura espontânea da infecção. Não temos relatos na literatura de outros primatas não humanos que tenham apresentado tal quadro clínico. Este perfil benigno da doença foi evidenciado no estudo post mortem que será descrito a seguir.

Os animais 64, 90 e 103 apresentaram quadros clínicos relativamente semelhantes entre si durante todo o período da infecção experimental com alterações cardíacas compatíveis com a insuficiência cardíaca humana sem sintomatologia (aumento do ICT, RVA, extra sístoles e BAV-1). Casos de insuficiência cardíaca sem sintomatologia e principalmente sem alterações ecocardiográficas são alvo de estudos direcionados a se compreender possíveis fatores ligados à progressão clínica da doença. Estudos realizados em pacientes chagásicos mostraram que a avaliação cardíaca através da pesquisa clínica envolvendo análises eletrocardiográficas, ecocardiográficas e radiológicas de rotina, bem como a avaliação dos protocolos de tratamento, têm demonstrado avanços substanciais na obtenção de dados que se correlacionam com a progressão clínica da doença. (Goldbraum et al., 2004; Siciliano et al., 2006).

O único animal a apresentar um desfecho clínico desfavorável foi o animal 95. O curso da doença em fase aguda foi semelhante aos demais animais infectados, apresentando alterações cardíacas tanto nos exames radiológicos, quanto no ECG (aumento do ICT, BAV-1 e RVA). No entanto, a progressão da doença foi diferente. Enquanto que nos demais animais não foi evidenciado agravamento no quadro clínico, este animal permaneceu com o ICT alterado e RVA, além de desenvolver BRE. Com as análises ecocardiográficas foi possível identificar que este animal desenvolveu alterações na fração de ejeção - FE , e assincronia do septo interventricular e, deste modo, classificá-lo como o único animal pertencente ao Estágio B pela ACC/AHA. As alterações ecocardiográficas em pacientes humanos, aliados aos achados eletrocardiográficos podem indicar os fatores de risco inerentes ao paciente chagásico, posto que exames ecocardiográficos, que demonstraram alterações no diâmetro ventricular sistólico esquerdo, na condução intraventricular aliados à presença de taquicardia ventricular sustentada foram considerados como fatores de risco para a progressão da cardiopatia em pacientes chagásicos crônicos (Viotti et al 2005). Recentemente foi proposto que a avaliação do fluxo mitral através do

Doppler, permite identificar anormalidades iniciais da função diastólica ventricular esquerda em pacientes chagásicos de fase indeterminada sem alterações eletrocardiográficas, radiológicas e ecocardiográficas pré-existentes (Cianciulli, et. al. 2006; Siciliano, et al. 2006).

Uma vez encerrados os estudos clínicos com os nossos animais, a avaliação post mortem nos remeteu a diversos pontos para reflexão no que tange aos possíveis desfechos clínicos que estes apresentariam se ainda estivessem mantidos sob condições experimentais.

Em nossos animais foi possível identificar a presença de infiltrado inflamatório de variados graus de intensidade e extensão, além da fibrose, como descrito no homem, mesmo que estes animais tenham sido infectados concomitantemente e sob as mesmas condições experimentais. Cada animal apresentou uma resposta inflamatória peculiar, dado este que está de acordo com relatos na literatura, onde análises histopatológicas realizadas em tecido cardíaco humano revelam uma miocardite que varia em intensidade (focal a difusa), com predominância de células mononucleares e degeneração de fibras musculares, com presença de hipertrofia de cardiomiócitos, associados à fibrose tecidual (Rossi, 1998; Abel, et. al, 2001; Elias, et. al, 2003; Higuchi, et. al, 2006). O animal 64, com 29 anos de idade, desenvolveu um processo inflamatório em todos os compartimentos cardíacos durante a fase crônica, porém somente apresentou fibrose moderada em átrio e ventrículo esquerdo sem demonstrar alteração cardíaca ao longo da infecção. O animal 95, único a apresentar, além de alterações elétricas, uma queda na fração de ejeção e aumento do diâmetro sistólico, dados que apóiam o diagnóstico de insuficiência cardíaca, não apresentou lesões inflamatórias e/ou fibróticas que explicariam tais alterações nos fragmentos analisados. Entretanto, o animal 103, com mínimo processo inflamatório, foi o mais acometido pela fibrose entre os animais infectados, com presença de alterações cardíacas comprovadas pelo ECG e RX. Diversos autores descrevem uma associação entre alterações cardíacas seguidas de morte, com a presença de processo inflamatório e fibrose cardíaca (Rossi, 1998; Palomino et. al, 2000; Albajar et. al, 2003; Schijman et. al, 2004). A avaliação utilizada para análise foi baseada na aleatoriedade obtida através de cortes uniformemente isotrópicos de fragmento retirado de parede livre dos compartimentos cardíacos. Assim, nossos resultados não apontam para uma associação entre a presença ou

intensidade do processo inflamatório e as alterações clínicas, evidenciadas pelo eletrocardiograma e ecocardiograma.

Outro dado que nos chamou a atenção foi o fato de encontrarmos um aumento na densidade dos vasos em ventrículo direito dos animais infectados. A vasculatura compreende cerca de 35% do volume do miocárdio (Weber et al., 1987) e o comprometimento microvascular é uma importante consequência da infecção pelo *T. cruzi*, onde o dano no endotélio é um fator que contribui grandemente para o desenvolvimento de vasoespasmos e isquemia (Tarleton et al., 2000). Higuchi et. al (2006) evidenciaram um aumento no número de capilares em ventrículo esquerdo em pacientes com cardiopatia chagásica crônica, indicando alterações estruturais inclusive em arteríolas cardíacas. Hassan et al.(2006), sugeriram que a infecção pelo *T. cruzi* estimula a proliferação de células musculares lisas e que esta proliferação esteja associada a uma regulação positiva da via que envolve a endotelina 1 e seu receptor ET_A. A endotelina foi considerada primeiramente como um peptídeo vasoativo liberado por células endoteliais, cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos por suas propriedades vasoconstritoras, porém após diversos estudos hoje é tratada como uma citocina pró-inflamatória, devido a sua íntima associação com os eventos inflamatórios por atuar na ativação de neutrófilos e monócitos para a produção de citocinas (Huang et al., 2001). Ainda não foi possível iniciar estudos quanto a presença de endotelina 1 no tecido cardíaco dos nossos animais, mas o aumento na densidade de volume de vasos nos animais infectados nos leva a hipótese de que este evento possa ser considerado benéfico uma vez que previne a formação de lesões isquêmicas que poderiam resultar em alterações cardíacas ainda mais graves.

Sabemos que o desenvolvimento da doença de Chagas é uma consequência de uma relação bastante extensa e complexa entre a persistência do parasita e os mecanismos homeostáticos no hospedeiro que levam a alterações patológicas (Marinho et al., 1999; Pérez-Fuentes et al., 2003). Neste contexto, podemos incluir a participação de citocinas, tanto na fase aguda como na fase crônica, em especial aquelas que estão relacionadas à resposta imune do tipo Th1 e sua participação no desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica em humanos. Dentre elas, o IFN- γ seria a citocina mais frequentemente demonstrada em pacientes chagásicos e que vem sendo relacionada com o desenvolvimento da cardiomiopatia (Abel et al., 2003; Gomes et al., 2003).

O infiltrado inflamatório encontrado nos animais infectados foi caracterizado como sendo predominantemente linfocitário, com predomínio de células TCD8⁺ (Carvalho, 2006). Encontramos uma associação entre a presença de infiltrado inflamatório e a presença de células expressando IFN- γ em dois dos três animais estudados, com frequência variando de 1 a 11 células por 50 campos avaliados (animal 64 e 95 respectivamente; $6 \pm 5,01$; média \pm erro padrão), dados estes que corroboram os descritos em pacientes humanos, onde foi possível encontrar uma correlação linear positiva entre a liberação de IFN- γ e a presença de linfócitos TCD8, sugerindo que estes linfócitos seriam os principais produtores de IFN- γ na fase crônica (Reis et al., 1997). Embora estes dois animais tenham apresentado perfis clínicos bastante distintos, quanto às alterações eletro e ecocardiográficas, o animal 64 apresentou maior acometimento inflamatório cardíaco e o maior número de células inflamatórias cardíacas expressando IFN- γ . Além disso, apresentou concomitantemente células secretoras de IL-10, mas na ausência de IL-12. Apesar de vários autores terem associado a elevada expressão de IFN- γ em tecido cardíaco de (Cunha-Neto et al., 1998, Abel et al., 2001, Cunha-Neto & Kalil, 2001) pacientes chagásicos e em associação com a gravidade da cardiopatia chagásica, temos que ser ponderados em nossas observações no modelo macaco rhesus pelo reduzido número de animais analisados. Analisamos três animais e em dois (macacos 64 e 95) encontramos que a expressão de IFN- γ intracardíaco parece estar associada à destruição das fibras miocárdicas; pois o maior número de células expressando esta citocina foi observada no animal que apresentava extensas lesões inflamatórias. Contudo, inversamente o animal 95 apresentou somente 1 célula expressando IFN- γ , com quadro inflamatório moderado o único que apresentou insuficiência cardíaca grave, representados por alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas. Podemos também supor que o animal 64 poderia estar na fase de progressão para a cardiopatia chagásica como consequência das lesões observadas. É relatado que em camundongos a presença de IFN- γ intracardíaco ocorre transitoriamente, não persistindo por mais de 9 semanas pós-infecção, não estando neste modelo associado ao desenvolvimento da cardiopatia chagásica (Zhang & Tarleton, 1995).

O IFN- γ tem sido extensivamente associado como uma citocina que controla o crescimento e disseminação do T. cruzi, possivelmente pela ativação de macrófagos e acredita-se que ele seja o indutor mais importante da iNOS, aumentando a produção de

óxido nítrico por estas células (Aliberti et al., 1999; Tarleton et al., 2004). Embora o óxido nítrico esteja implicado em ser essencial para o controle do T. cruzi na fase aguda inicial da infecção, estudos demonstram que este papel fundamental não se repete na fase aguda tardia e fase crônica da doença (Machado et al., 2000; Saeftel, et al., 2001).

Foi possível encontrar uma associação entre a presença de infiltrado inflamatório, liberação de IFN- γ e a expressão de iNOS em nossos animais, independente do perfil clínico.

É relatado que o NO está relacionado com o estabelecimento da infecção crônica e pelo desenvolvimento e progressão das alterações cardíacas associado a citocinas pró-inflamatórias em modelos experimentais (Millar & Kahn, 2000; Chandra et al.; 2002).

O papel dos radicais de nitrogênio tem sido cogitado na biologia da isquemia cardíaca como sendo indutores de apoptose de miócitos quando níveis elevados de iNOS estão biodisponíveis no tecido cardíaco ou na prevenção da apoptose quando níveis basais de eNOS, produzido por células endoteliais estão presentes (Razavi et al., 2005). Recentemente foi descrito que a iNOS parece estar associada, tanto endógenamente como exógenamente, na prevenção de injúrias do miocárdio, podendo ser considerada como uma proteína protetora (revisto por Jones & Bolil, 2006). Outras associações podem também estar relacionadas à presença de iNOS e TNF α , como tromboembolismo e baixa contratilidade das fibras cardíacas em pacientes com cardiopatia dilatada (Habib et al., 1995), visto pela elevada expressão de iNOS pelos miócitos. Assim, ainda é dúvida o papel da iNOS no tecido cardíaco. Na doença de Chagas, a iNOS está presente no coração de camundongos infectados pelo T. cruzi e sua expressão é modulada pela presença de TNF α , MCP, MIP-2 (Machado et a., 2000). Da mesma forma, ratos infectados e analisados na fase aguda mostram elevada expressão de iNOS em células mononucleares e cardiomiócitos durante a fase aguda, mesmo na ausência de infiltrado inflamatório (Chandrasekar et al., 1998).

Infelizmente para termos uma real percepção do papel da iNOS e de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias na cardite chagásica humana seria necessário um número maior de indivíduos e, desta maneira, avaliar todas as variáveis para encontrar correlações entre os achados durante o longo percurso da doença de Chagas. No entanto, ainda hoje o papel da iNOS na defesa do hospedeiro humano frente às infecções permanece obscuro

(Nathan, 2006). Assim, ainda permanece a questão principal, se a resposta imune mediada pela liberação de IFN- γ e iNOS presentes no infiltrado inflamatório cardíaco seria responsável pela indução da cardiopatia chagásica crônica e/ou se os níveis de iNOS liberados pelos cardiomiócitos, independente da iNOS “imune” poderia influenciar na degeneração do tecido cardíaco, logo numa fase inicial da cardiopatia chagásica crônica.

Outros mecanismos que podem estar relacionados à relação iNOS/T. cruzi/processo inflamatório, são: i) o crescimento do T. cruzi estar associado à dependência do parasita da L-arginina do hospedeiro para síntese de poliaminas (Piacenza et al.; 2001); ii) a interação com TGF- β para inibir a produção do NO, favorecendo o crescimento do parasito pelo consumo da L-arginina disponível, iii) ou, como hipótese, pela indução do processo inflamatório pelo parasita para assegurar sua sobrevivência intracelular na fase crônica, o que culminaria na produção em excesso de L-arginina para seu consumo.

Por outro lado IL-4 e IL-10 são capazes de modular negativamente o controle do T. cruzi pela supressão de células produtoras de IFN- γ e em conseqüência os macrófagos. Assim, o balanço entre a expressão cardíaca de IFN- γ , IL-10 e IL-4 pode sugerir o equilíbrio entre o patógeno e o hospedeiro. Em nosso estudo, IL-10 e IL-4 foram observadas somente em um animal (macaco 64) concomitantemente com IFN- γ . A relação IL-10/ IFN- γ foi de 1:2,2 e de IL-4/IFN- γ foi de 1:2,7, neste animal. Da mesma forma a relação iNOS/ IFN- γ foi de 1:15,7. Desta forma, nos parece que mesmo na presença concomitante de citocinas Th1 e Th2, a produção de iNOS não é diminuída quando há uma secreção maior de IFN- γ . Por outro lado, camundongos deficientes na expressão de IL-10 apresentam baixa parasitemia circulante e nos tecidos com expressão elevada de IFN- γ e iNOS. Estes dados sugerem que IL-10 tem papel regulador e impede o controle do crescimento parasitário (Abrahamsohn et al, 1996).

6 CONCLUSÕES

1. O modelo experimental em macaco rhesus apresenta quadros clínicos compatíveis com os descritos na doença de Chagas humana;
2. A cura espontânea em fase crônica de um animal infectado (animal 99) pode estar relacionada à fase aguda branda, com ausência de sinais clínicos;
3. A densidade de volume de vasos no ventrículo direito dos animais infectados pode estar associada à evolução benigna da doença;
4. A presença de infiltrado inflamatório e a liberação de IFN- γ e expressão de iNOS não refletem as alterações clínicas cardíacas no nosso modelo;
5. Os critérios de avaliação clínica sugeridos pelo Consenso Brasileiro em Doença de Chagas podem ser utilizados para a classificação clínica da doença de Chagas em primatas não humanos.
6. Apesar da coexistência de citocinas Th1 e Th2, houve predomínio da resposta Th1 neste modelo experimental.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, L. C. J.; RIZZO, L. V.; IANNI, B.; ALBUQUERQUE, F.; BACAL, F.; CARRARA, D.; BOCCHI, E. A.; TEIXEIRA, H. C.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHANEITO, E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN γ response to *T. cruzi* infection. *Journal of autoimmunity*. 2001. 17: 99-108.

ALIBERTI, J. C.; MACHADO, F. S.; SOUTO, J. T.; CAMPANELLI, A. P.; TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. β -chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity*. 1999. 67: 4819-4826.

ALTEMANI, A. M.; BITTENCOURT, A. L.; LANA, A. M. A. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas' disease: a qualitative and quantitative analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000. 62 (2): 319-324

ANNEZ, N.; CARRASCO, H.; PARADA, H.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; FUENMAYOR, C.; GONZALEZ, N.; PERCOCO, G.; BORGES, R.; GUEVARA, P.; RAMIREZ, J. L. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop. Med. Hyg.* 1999. 60 (5): 726-732.

ANVISA, 2005 - <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2005/290305.htm> Acesso em 20/10/2005

ARAÚJO-JORGE, T. C; CASTRO, S. L. Doença de Chagas – manual para experimentação animal. 2000. Ed. Fiocruz – Rio de Janeiro. 368 p.

BAHIA, M. T.; TAFURI, W. L.; CALIARI, M. V.; VELOSO, V. M.; CARNEIRO, C. M.; COELHO, M G. L. L.; LANA, M. Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs

inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002. 35 (4): 339-345.

BIRON, C. A.; GAZZINELLI, R. T.; Effects of IL-12 on immune response to microbial infection: a key mediator in regulating disease outcome. *Curr. Opin. Immunol*. 1995. 7:485.

BONECINI-ALMEIDA, Maria da Glória; CASTRO, Bernardo Galvão; PESSOA, Maria H. Ribeiro; PIRMEZ, Claude; LARANJA, Francisco. Experimental Chagas' disease in Rhesus monkeys. I. Clinical, parasitological, hematological and anatomo-pathological studies in the acute and indeterminate phase of the disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1990.85 (2): 163-171.

BRAGA, J. C. V.; REIS, F.; ARAS, R.; COSTA, N. D.; BASTOS, C.; SILVA, R.; SOARES, A.; MOURA-JÚNIOR, A.; ÁSFORA, S.; LATADO, A. L. Clinical and therapeutics aspects of heart failure due to Chagas disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2006. 86 (4): 296-298.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*. 1973. 27: 347-382.

BURLEICH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol*. 1995. 49: 175-200.

CALAROTA, S. A.; OTERO, M.; HERMANSTAYNE, K.; LEWIS, M.; ROSATI, M.; FELBER, B. K.; PAVLAKIS, G. N.; BOYER, J. D.; WEINER, D. B. Use of interleukin 15 to enhance interferon- γ production by antigen-specific stimulated lymphocytes from rhesus macaques. *Journal of Immunological Methods*. 2003. 279: 55-67.

CALIARI, M. V.; MACHADO, R. P.; LANA, M.; CAJÁ, R. A. F.; CARNEIRO, C. M.; BAHIA, M. T.; SANTOS, C. A. B.; MAGALHÃES, G. A.; SAMPAIO, I. B. M.; TAFURI,

W. L. Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 2002. 44: página!!!!

CARVALHO, Cristiano M. Espínola; ANDRADE, Márcia C. R.; XAVIER, Sérgio S.; MANGIA, Regina H.R.;BRITTO, Constança C.; JANSEN, Ana M.; FERNANDES, Octávio F.; VIEIRA, Joseli L.; ALMEIDA, Maria da G. Bonecini. Chronic Chagas disease in rhesus monkeys (Macaca mulatta): Evaluation of parasitemia, serology, electrocardiography, echocardiography and radiology. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2003. 68(6): 683-691p.

CARVALHO, Cristiano M. Espínola. Infecção crônica experimental de macacos rhesus (Macaca mulatta) pelo Trypanosoma cruzi: caracterização do modelo experimental e imunopatogênese da cardiomiopatia. Tese de doutorado. Instituto Oswaldo Cruz. 2006. 200 p.

CARRASCO, G. H. A.; PALACIOS, E.; DAGERT, S. C.; MOLINA, C.; INGLESSIS, G.; MENDOZA, R. V. Clinical, histochemical and ultrastructural correlation in septal endomyocardial biopsies from chronic chagasic patients. Detection of early myocardial damage. Am. Heart J. 1987; 113: 716-24.

CASADO, J; DÁVILA, D. F.; TORRES, A.; PAYARES, A.; COLMENARES, R. Cardiac autonomic control mechanisms in Chagas' heart disease. Int. J. Cardiol. 1990. 27: 55-2.

CHAGAS, C. 1909. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. g. sp. Agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1909; 2 (1): 159-218 p.

CHANDRA, M.; TANOWITZ, H. B., PETKOVA, S. B.; HUANG, H.; WEISS, L. M.; WITTNER, M.; FACTOR, S. M.; SHTUTIN, V.; JELICKS, L. A.; CHAN, J.; SHIRANI, J. Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by Trypanosoma cruzi (Talahuen strain). : Int J Parasitol. 2002. Jun 15;32(7):897-905

CHANDRASEKAR, B.; MELBY, P. C.; TROYER, D. A.; FREEMAN, G. L. Differential regulation of nitric oxide synthase isoforms in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. *Clin. Exp. Immunology*. 2000. 121: 112-119.

CIANCIULLI, T.; LAX, J. A.; SACCHERI, M. C.; PAPANTONIOU, A.; MORITA, L. A.; PRADO, N. G.; DORELLE, A. N.; RIARTE, A. R.; PREZIOSO, H. A. Early detection of left ventricular diastolic dysfunction in Chagas disease. *Cardiovascular ultrasound*. 2006. 4 (18): 1-7.

COURA, José R.; JUNQUEIRA, Angela C. V.; BOIA, Márcio N.; FERNANDES, Octávio. Chagas Disease: from Bush to Huts and Houses. Is it the Case of the Brazilian Amazon? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1999. 94, Suppl. I: 379-384.

CROSS, G. A. M. 2005 Trypanosomes at the gates. *Science*, 309, Issue 5733, 355. 2005

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infection and Immunity*. 2004. 72 (7): 4081-4089.

CUNA, W. R.; CUNA, C. R. Characterization of T cell clones from chagasic patients: predominance of CD8 surface phenotype in clones from patients with pathology. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995 Jul-Aug;90(4):503-6.

CUNHA-NETO, E.; KALIL, J. Heart-infiltrating and peripheral T cells in the pathogenesis of human Chagas' disease cardiomyopathy. *Autoimmunity*, 2001. 34: 187-192.

D'ÁVILA REIS, D.; JONES, E. M.; TOSTES, S.; LOPES, E. R.; GRAZZINELLI, G.; COLLEY, D.G.; McCURLEY, T. L. Characterization of inflammatory infiltrates in a

chronic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 1993; 48: 637-44.

DIAS, João C. P.; COURA, José R. *Clínica e terapêutica da doença de Chagas – uma abordagem prática para o clínico geral*. I. Ed. Fiocruz: Rio de Janeiro. 1997. 486 p.

DIEGO, J. A.; PALAU, M. T.; GAMALLO, C.; PENIN, P. Are genotypes of *Trypanosoma cruzi* involved in the challenge of chagasic cardiomyopathy? *Parasitol Res* 1998. 84: 147-152.

DANSON, E. J.; PATERSON, D. J. Cardiac neurobiology of nitric oxide synthases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005. 1047: 183-196.

ELIAS, F. E.; VIGLIANO, C. A.; LAGUENS, R. P.; LEVIN, M. J.; BEREK, C. Analysis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in the heart tissue of three patients with chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003. 68 (2): 242-247.

FABRINO, D. L.; LEON, L. L.; PARREIRA, G. G.; GENESTRA, M.; ALMEIDA, P. E.; MELO, R. C. Peripheral blood monocytes show morphological pattern of activation and decreased nitric oxide production during acute Chagas' disease in rats. *Nitric Oxide*. 2004 Sep;11(2):166-74.

FALASCA, A.; GRANA, D.; BUCCOLO, J.; GILI, M.; MERLO, A.; ZOPPI, J.; MARESO, E. Susceptibility of the *Cebus apella* monkey to different strains of *T. cruzi* after single or repeated inoculations. *Bull Pan Am Health Organ.* 1986;20(2):117-37.

FIOCRUZ, 2006. Doença de Chagas. Acesso em 01/05/2006 em: http://www.fiocruz.br/ccs/opiniao/chagas_yara.htm

FRANCOLINO, S. S.; ANTUNES, ^a F.; TALICE, R.; ROSA, R.; SELANIKIO, J.; REZENDE, J. M.; ROMANHA, A. J.; DIAS, J. C. P. New evidence of spontaneous cure in

human Chagas' disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2003. 36 (1): 103-107 p.

FULLER, C. L.; CHOI, Y. K.; FALLERT, B. A.; CAPUANO, S.; RAJAKUMAR, P.; MURPHEY-CORB, M.; REINHART, T. A. Restricted SIV replication in rhesus macaque lung tissues during acute phase of infection. *American Journal of Pathology*. 2002. 161 (3): 969-976.

GIRONÉS, N.; FRESNO, M.. Etiology of Chagas' disease myocarditis: autoimmunity, parasite, persistence, or both? *Trends Parasitology*. 2003. 19: 10-22.

GOLDBAUM, M.; AJIMURA, F. Y.; LITVOC, J.; CARVALHO, S. A.; ELUF-NETO, J. American trypanosomiasis and electrocardiographic alterations among industrial workers in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 2004. 46 (6): 299-302.

GOMES, J. A. S.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; ROCHA, M. O.; MARTINS-FILHO, O. A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infection and Immunity*. 2003. 71 (3): 1185-1193.

GOMES, J. A. S.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; ROCHA, M. O.; BUSEK, S. C. U.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA, J. S.; CORREA-OLIVIERA, R. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infection and immunity*. 2005. 73 (12): 7960-7966.

GREEN, S. J. ; NACY, C. A. L-arginine-derived nitric oxide is an antimicrobial effector molecule. *Features*, 1994. 60 (2), 83-86.

GUEDES, P. M. M.; VELOSO, V. M.; TAFURI, W. L.; GALVÃO, M. C.; CARNEIRO, C. M.; LANA, M.; CHIARI, E.; SOARES, K. A.; BAHIA, M. T. The dog as model for chemotherapy of Chagas' disease. *Acta Tropica*. 2002. 84: 9-17.

HASSAN, G. S.; MUKHERJEE, S.; NAGAJYOTHI, F.; WEISS, L. M.; PETKOVA, S. B.; ALMEIDA, C. J.; HUANG, H.; DESRUISSEAU, S.; BOUZAHZAH B.; PESTELL, R. G.; ALBANESE, C.; TANOWITZ, H. B. Trypanosoma cruzi infection induces proliferation of vascular smooth muscle cells. *Infection and Immunity*. 2006. 74 (1): 152-159.

HIGUCHI, M. L.; BRITO, T.; REIS, M.; BARBOSA, A.; BELLOTTI, G.; BARRETO, A. C. P.; PILLEGI, F. Correlation between T. cruzi parasitism and myocardial inflammation in human chronic myocarditis. Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovascular Pathology*. 1993. 2: 101-106.

HIGUSHI, M. L. Chronic chagasic cardiopathy: the product of a turbulent host-parasite relationship. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1997. 39(1):53-60

HIGUCHI, M. L.; FUKASAWA, S.; DE BRITO, T.; PARZIANELLO, L. C.; BELLOTTI, G.; RAMIRES, J. A. F. Different microcirculatory and interstitial matrix patterns in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' disease: a three dimensional confocal microscopy study. *Heart*. 1999. 82: 279-285.

KRETTLI A. U.; BRENER, Z. Resistance against Trypanosoma cruzi associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunology*. 1982. 128: 2009-20012.

KUMMER, W.; STOMMEL, C.; GRAU, V. MHC class II antigen-expressing cells in cardiac ganglia of the rat. *Cell Tissue Res*. 2005 Jan;319(1):37-48. Epub 2004 Oct 27

LARANJA, F. S.; DIAS, E.; DUARTE, E.; PELEGRINO, I. Observações clínicas e epidemiológicas sobre a moléstia de Chagas no Oeste de Minas Gerais. *O Hospital*. 1951. 40: 137-192.

LARANJA, F. S.; DIAS, E.; DOBREGA, G.; MIRANDA, A. Chagas diseases: a clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation* 1956. 14: 1035-60.

LEON, J. S.; ENGMAN, D. M. Autoimmunity in Chagas' heart disease. *Int. J. Parasitol.* 31: 555-561.

LÓPEZ, L.; ARAI, K.; GIMÉNEZ, E.; JIMÉNEZ, M.; PASCUZO, C.; RODÍGUEZ-BONFANTE, C.; BONFANTE-CABARCAS, R. Las concentraciones séricas de interleucina-6 y proteína reactiva se incrementan a medida que la enfermedad de Chagas evoluciona hacia el deterioro de la función cardíaca. *Rev. Esp. Cardiol.* 2006. 59:50-56.

LUKSIC, A. D. Oxido Nítrico: Noble o villano? Acesso em 01/08/2005

http://www.indexmedico.com/publicaciones/journals/revistas/bolivia/instituto_sucre/edicion1/dubravcic2.htm

MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C.; MESTRINER, F. L. A. C.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation.* 2000. 12: 3003-3008.

MADISON, D. V. Pass the nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1993 May 15;90(10):4329-31

MÄKITALO, B.; ANDERSSON, M.; ARESTROM, I.; KARLÉN, K.; VILLINGER, F.; ANSARI, A.; PAULIE, S.; THORSTENSSON, R.; AHLBORG, N. ELISpot and ELISA analysis of spontaneous mitogen-induced and antigen-specific cytokine production in cynomolgus and rhesus macaques. *Journal of Immunological Methods.* 2002. 270: 85-97

MARINHO, C. R. F.; BUCCI, D. Z.; DAGLI, M. L.; BASTOS, K. R. B.; GRISOTTO, M. G.; SARDINHA, L. R.; BAPTISTA, C. R. G. M.; GONÇALVES, C. P.; LIMA, M. R. D.; ALVAREZ, J. M. Pathology affects two different organs in two mouse strains chronically infected by a Trypanosoma cruzi clone: a model for genetic studies of Chagas' disease. *Infec. and Immunity.* 2004. 72 (4): 2350-2357.

MARINHO, C. R. F.; LIMA, M. R. D.; GRISOTTO, M. G.; ALVAREZ, J. M. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas's disease. *Infection and Immunity*. 1999. 308-318.

MARINO, A. P. M. P.; SILVA, A. A.; SANTOS, P. V. A.; PINTO, L. M. O.; GAZINELLI, R. T.; TEIXEIRA, M. M.; LANNES-VIEIRA, J. CC-chemokine receptors: a potential therapeutic target for *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2005. 100(Suppl. I): 93-96.

MARSDEN, P. D.; SEAH, S. K. K.; DRAPER, C. C.; PETTITT, L. E.; MILES, M. A.; VOLLER, A. Experimental *Trypanosoma cruzi* infections in rhesus monkeys II. The early chronic phase. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1976. 70 (3): 247-532.

MATTFELDT, T.; MAA, G.; GHAREHBAGHI, H.; MOLLER, P. Estimation of surface area and length with the orientator. *J. Microsc.* 1990. 159: 301-317.

MEIRELLES, M. N. L.; BONECINI-ALMEIDA, M. G.; PESSOA, M. H. R.; GALVÃO-CASTRO, B. *Trypanosoma cruzi*: experimental Chagas' disease in rhesus monkeys. II. Ultrastructural and cytochemical studies of peroxidase and acid phosphatase activities. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1990. 85 (2): 173-181 p.

MICHAILOWSKY, V.; SILVA, N. M.; ROCHA, C. D.; VIEIRA, L. Q.; LANNES-VIEIRA, J.; GAZZINELLI, R. T. Pivotal role of interleukin-12 and Interferon- γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. 2001. *American Journal of Pathology*, 159 (5): 1723-1733.

MILES, M. A.; MARSDEN, P. D.; PETTIT, L. E.; DRAPER, C. C.; WATSON, S.; SEAH, S. K. K.; HUTT, M. S. R.; FOWLER, J. M.. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in

rhesus monkeys, III. Electrocardiographic and histopathological findings. *Trans. Roy Soc Trop Med Hyg* . 1979. 73: 528-32.

MILLAR, Amanda E.; KAHN, Stuart J. Trypanosoma cruzi: Effect of nitric oxide synthesis on the CD4 T cell response to the trans – sialidase superfamily. *Experimental Parasitology*. 2000. 94: 84 – 91.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brazilian Consensus on Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005.38 Suppl 3:7-29.

MOLINA, A. S.; CORTÉS, E. C.; CAMPOS, E. S.; ROJO, C. C.; ZAMUDIO, J. G.; GUERRERO, M. C. Papel patofisiológico del óxido nítrico mitocondrial. *Mensaje Bioquímico*. Acesso em 28/05/2004; em <http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>

MOORE, D. ; ROWLAND, E. Discovery and characterization of an antibody anti-egressin, that is able to inhibit Trypanosoma cruzi egress in vitro. *J. Parasitol*. 2004. 90 (3); 524-530

MUNIZ, J.; SOARES, R. R.; SOUZA, M. A.; QUINTAO, L. G South American Trypanosomiasis (Chaga's disease) within the concepts of immunopathology. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*. 1970. Apr-Dec;22(2): 281-354

MUNIZ, J.; SOARES, R. R.; SOUZA, M. A.; QUINTAO, L. G. American trypanosomiasis (Chagas' disease in the immunopathology concept). *Rev Bras Malariol Doencas Trop*. 1970. Apr-Dec;22(2):355-410.

NATHAN, C. F.; HIBBS, J. B. Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.*. 1991. 3 (1): 65-70.

PALOMINO, S. A. P.; AIELLO, V. D.; HIGUCHI, M. L. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and Trypanosoma cruzi antigens. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000. 94 (6): 571-579.

PELUFFO, G.; PIACENZA, L.; IRIGOÍN, F.; ALVAREZ, M. N.; RADI, R. L-Arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Trends in Parasitology*, 2004. 20 (8): 363-369.

PEREIRA, J. B.; WILLCOX, H. P.; COURA, J. R. Morbidity in Chagas' disease. III. Longitudinal study of 6 years, in Virgem da Lapa, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1985 Jan-Mar;80(1):63-71.

PEREZ-FUENTES, R.; GUEGAN, J. F.; BARNABE, C.; LOPEZ-COLOMBO, A.; SALGADO-ROSAS, H.; TORRES-RASGADO, E.; BRIONES, B.; ROMERO-DIAS, M.; RAMOS-JIMENEZ, J.; SANCHEZ-GUILLEN, M. C. Severity of chronic Chagas' disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *Int J Parasitol*. 2003 Mar;33(3):293-9.

PLENTZ, R. D. M.; IRIGOYEN, M. C.; MULLER, A. S.; CASARINI, D. E.; RUBIRA, M. C.; JUNIOR, H. M.; MADY, C.; IANNI, B. M.; KRIEGER, E. M.; CONSOLIN-COLOMBO, F. Venous endothelial dysfunction in Chagas' disease patients without heart failure. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2006. 86 (6): 466-71.

ROSSI, M. A. Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. *International Journal of Cardiology*. 1998. 66: 183-194.

REIS, D. D.; JONES E. M.; TOSTES, S.; LOPES, E. R.; GRAZZINELLI, G.; COLLEY, D. G.; Chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α + cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg*. 1993. 48:637.

REIS, M. M.; HIGUCHI, M. L.; BEVENUTTI, L. A.; AIELLO, V. D.; GUTIERREZ, P. S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. An in Situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R⁺ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1997. 83 (2): 165-172.

REIS, M. M.; HIGUCHI, A. L.; AIELLO, V. D.; BENVENUTI, L. A.. Fatores de crescimento presentes no miocárdio de pacientes com cardiopatia chagásica crônica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2000. 33 (6): 509-518.

RODRIGO, J.; ALONSO, D.; FERNÁNDEZ, A. P.; SERRANO, J.; LÓPEZ, J. C.; ENCINAS, J. M.; VIZARRA, P. F.; CASTRO, S.; PEINADO, M. A.; PEDROSA, J. A.; RICHARD, A.; MARTÍNEZ-MURILLO; SANTACANA, M.; BENTURA, M. L.; UTTENTHAL, R. L. O. Nitric Oxide: synthesis, neuroprotection and neurotoxicity. *An. Sist. Sanit Navar*, 2000. May- Aug 23 (2), 105-235.

ROSENBAUM, M. B.; Chagasic myocardopathy. *Progress in cardiovascular diseases*. 1964; 7: 199-225.

SAEFTEL, M.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity*. 2001. 69 (4): 2252-2259.

SANTOS, P. V. DOS; ROFFE, E.; SANTIAGO, H. C.; TORRES, R. A.; MARINO, A. P.; PAIVA, C. N.; SILVA, A. A.; GAZZINELLI, R. T.; LANNES, J. V. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect*. 2001 Oct;3(12):971-84.

SCHARFSTEIN, Júlio; MORROT, Alexandre; A role of extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1999. 94 s.1: 51-63

SCHIJMAN, A. G.; VIGLIANO, C. A.; VIOTTI, R. J.; BURGOS, J. M.; BRANDARIZ, S.; LOCOCO, B. E.; LEZE, M. I.; ARMENTI, H. A.; LEVIN, M. J. *Trypanosoma cruzi* cardiac lesions of argentinean patients with end-stage chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2004. 70 (2): 210-220.

SEAH, S. K. K. Experimental Trypanosoma cruzi in rhesus monkeys- the acute phase. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1974. 68 (1): 63 – 69.

SHILOH, M. U.; MACMICKING, J. D.; NICHOLSON, S.; BRAUSE, J. E.; POTTER, S.; MARINO, M.; FANG, F.; DINAUER, M.; NATHAN, C. Phenotype of mice and macrophage deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. Immunity. 1999. 10: 29.

SICILIANO, A. P. R. V.; HASSLOCHER-MORENO, A.; SOUZA, A. S. S.; BRASIL, P. E. A. A.; HOLANDA, M. T.; GARCIA, M. Y.; XAVIER, S. S. Padrão da função diastólica e relação com a gravidade da forma clínica em 902 pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Revista da SOCERJ. 2006. 19 (1): 74-83.

SILVA, A. M.; RAMIREZ, L.; VARGAS, M.; CHAPADEIRO, E.; BRENER, Z. Evaluation of the rabbit as a model for Chagas disease-II. Histopathologic studies of the heart, digestive tract and skeletal muscle. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996 Mar-Apr;91(2):199-206.

SOARES, Milena B. P.; SANTOS, Ricardo R. dos; Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1999. 94s (1)

TALVANI, A.; RIBEIRO, C. S.; ALIBERTI, J. C. S.; MICHAILOWSKY, V.; SANTOS, P. V. A.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; ALMEIDA, I. C.; FARBER, J.; LANNES-VIEIRA, J.; SILVA, J. S.; GAZZINELLI, R. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-g as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with Trypanosoma cruzi. Microbes and Infection. 2000. 2: 851-866.

TALVANI, A.; ROCHA, M. O. C.; COGAN, J.; MAEWAL, P.; LEMOS, J.; RIBEIRO, A. L. P.; TEIXEIRA, M. M. Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in chagasic cardiomyopathy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2004. 99 (6): 645-649.

TARLETON, R. L.; GRUSBY, M. J.; POSTAN, M.; GLIMCHER, L.H. Trypanosoma cruzi infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol.* 1996. Jan;8(1):13-22.

TARLETON, R. L. Chagas disease: a role for autoimmunity. *Trends in Parasitology.* 2003. 19 (10): 447-451.

TEIXEIRA, A. R. L.; FIGUEIREDO, F.; REZENDE-FILHO, J.; MACÊDO, V. Chagas' disease: a clinical, parasitological, immunological and pathological study in rabbits. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1983. 32 (2): 258-272.

TEIXEIRA, A. R.; CUNHA-NETO, E.; RIZZO, L. V.; SILVA, R. Trypanocidal nitroarene treatment of experimental Trypanosoma cruzi infection does not prevent progression of chronic-phase heart lesions in rabbits. *J. Infec. Dis.* 1990. 162: 1420.

TEIXEIRA, A. R.; SANTOS-BUCH, C. A. The immunology of experimental Chagas' disease. II. Delayed hypersensitivity to Trypanosoma cruzi antigens. *Immunology.* 1975 Mar;28(3):401-10.

TEIXEIRA, A. R.; TEIXEIRA, M. L.; SANTOS-BUCH, C. A. The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. *Am J Pathol.* 1975 Jul;80(1):163-80.

TEIXEIRA, A. R.; FIGUEIREDO, F.; REZENDE FILHO, J.; MACEDO, V. Chagas' disease: a clinical, parasitological, immunological, and pathological study in rabbits. *Am J Trop Med Hyg.* 1983 Mar;32(2):258-72.

THOMSON, L.; DENICOLA, A.; RADI, L. The trypanothione-thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Arch Biochem Biophys*. 2003 Apr 1;412(1):55-64.

TORRES, C. M. Sobre a anatomia patológica da doença de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1941. 36: 391-404.

UNE, C.; ANDERSSON, J.; ORN, A. Role of IFN γ and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon- γ production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. 2003. 134: 195-201.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; PETTI, M.; BERTOCCHI, G.; ÁLVAREZ, M. G.; ARMENTI, A. Clinical predictors of chronic chagasic myocarditis progression. *Revista española de cardiología*. 2005. 58 (9): 1037-1044.

WHO/TDR, 2004. Doença de Chagas. Acesso em 20/08/2005
<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/default.htm>
<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>
<http://www.who.int/ctd/chagas/achieve.htm>

XAVIER, S. S.; SOUZA, A. S.; HASSLOCHER-MORENO, A. Aplicação da nova classificação da insuficiência cardíaca (ACC/AHA) na cardiopatia chagásica crônica: análise crítica das curvas de sobrevida. *Revista da SOCERJ*. 2005. 18(3): 227-232.

ZARLINGO, T. J.; EIS, A. L. W.; BROCKMAN, D. E.; KOSSENJANS, W.; MYATT, L. Comparative localization of endothelial and inducible nitric oxide synthase isoforms in haemochorial and epitheliochorial placentae. *Placenta*. 1997. 18:511-520.

ZELEDÓM, R.; DIAS, J. C. P.; BRILLA-SALAZAR, ^a; REZENDO, J. M; VARGAS, L. G.; URBINA, A. Does a spontaneous cure for Chagas' disease exist? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1988. 21: 15-20 p.

ZUBER, B.; QUIGLEY, M.F.; CRITCHFIELD, J. W.; SHACKLETT, B. L.; ABEL, K.; MILLER, C. J.; MORNER, A.; PAULIE, S.; AHIBORG, N.; SANDBERG, J. K. Detection of macaque perforin expression and release by flow cytometry, immunohistochemistry, ELISA and ELISpot. *Journal of Immunological Methods*. 2006. 312: 45-53.

ZULANTAY, I.; ARRIBADA, A. C.; HONORES, P.; SÁNCHEZ, G.; SOLARI, A.; ORTIZ, S.; OSUNA, A.; RODRÍGUEZ, J.; APT, W. La mejoría electrocardiográfica con el tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica, es independiente de la persistencia de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Méd. Chile*. 2005.133 (10): 1153-1160.

ANEXO 1

Materiais e métodos referentes à fase aguda e crônica do grupo de macacos rhesus estudados no presente trabalho

Tabela 1: Acompanhamento da infecção experimental pelo *Trypanosoma. cruzi* de longa duração em macacos rhesus (*Macaca mulata*): relação dos animais de acordo com a idade, peso corpóreo, inóculo e período de infecção.

Macacos	Idade (anos) ^a	Peso Corporal ^a (kg)	Inóculo ^b	Período de Infecção (anos)	Peso Corporal ^c (kg)	Idade (anos) ^c
Infectados						
64	6,0	12,0	1,2	23,0	11,6	29,0
90	5,5	9,0	1,7	20,0	12,8	26,0
95	4,4	9,9	1,5	20,0	16,1	25,0
99	4,6	7,9	1,9	20,0	14,6	25,0
103	4,5	8,7	1,7	20,0	13,7	25,0
<i>Média</i>	5,0	9,5	1,6	20,6	13,7	26,0
<i>SD</i>	0,7	1,4	0,3	1,3	1,7	1,7
Controles						
81	4,6	8,4			11,6	25,0
94	5,5	8,5			16,1	26,0
<i>Média</i>	5,1	8,5			13,8	25,5
<i>SD</i>	0,6	0,1			3,1	0,7

^a ao serem infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*; ^bnº de formas tripomastigotas metacíclicas x 10³/kg de peso ^c ao serem eutanasiados; SD= desvio padrão

Fonte: Bonecini-Almeida et. al, 1991; Carvalho et al., 2003; Carvalho, 2006

1 Demonstração da parasitemia

1.1 Fase aguda

Durante a fase aguda, a parasitemia direta foi realizada semanalmente e demonstrada em Bonecini-Almeida et al., 1991, como descrito a seguir: Após punção venosa, uma alíquota de sangue foi diluída 1:50 e 10 µl desta diluição foi colocada em câmara de Neubauer. O número de formas tripomastigotas foi contado e acertado para ml de sangue. A leitura foi realizada em microscópico óptico (Tabela 2).

Tabela 2: Acompanhamento da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em macacos rhesus (*Macaca mulata*) – Parasitemia direta (mm³ de sangue)

Macaco	Semanas pós-infecção									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
64	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
90	N	N	2,0 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁵	N	N	N
95	N	N	2,0 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴	N	N	N
99	N	2,0 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁵	7,0 x 10 ⁴	N	N	N
103	N	2,0 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁴	5,0 x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁴	N	N	N

Fonte: Bonecini-Almeida, et al., 1991. N= parasitemia negativa; NR = não realizado

1.2 Fase crônica

Após a negatização da parasitemia direta na fase aguda, os animais foram monitorados através de métodos indiretos para a identificação de formas circulantes do *T. cruzi*. Com 16 anos de infecção, os parasitas foram identificados por xenodiagnóstico artificial e/ou hemocultivo e/ou PCR (Carvalho et al., 2003).

A Tabela 3 apresenta a evolução da parasitemia dos animais utilizados no presente estudo através da hemocultura e xenodiagnóstico.

Tabela 3: Acompanhamento da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* de longa duração em macacos rhesus (*Macaca mulata*): Hemocultura e Xenodiagnóstico.

Macaco	Exames Parasitológicos					
	Avaliação 1 ^a		Avaliação 2 ^b		Avaliação 3 ^c	
	Hemo	Xeno	Hemo	Xeno	Hemo	Xeno
64	N	P	N	NR	N	NR
90	N	N	N	NR	N	N
95	N	P	N	P	N	NR
99	N	N	N	NR	N	N
103	P	N	NR	P	NR	NR

NR: não realizado; P= positivo; N= negativo

^a 15 anos p. i.; ^b 15,5 anos p. i. e ^c 15,8 anos p. i.

Fonte: Carvalho et. al., 2003 e 2006

2 Análises Eletrocardiográficas, radiológicas e ecocardiográficas

Análises prévias quanto ao histórico clínico de cada animal, bem como todas as análises eletrocardiográficas e ecocardiográficas foram previamente publicadas por Bonecini-Almeida et al., 1990 e Carvalho et al., 2003 e 2006. O eletrocardiograma foi realizado em todos os animais semanalmente até o 5º mês p. i. utilizando-se de um eletrocardiógrafo de 3 canais (FAKUDA, FP 31 P) com seus eletrodos substituídos por agulhas hipodérmicas metálicas (30 XB). Os animais foram submetidos a anestesia com ketamina e as avaliações foram realizadas em 6 derivações periféricas (D1, D2, D3, aVF, aVR e aVL) e com três derivações precordiais (V1, V3 e V5). Todos os animais foram submetidos a avaliações controles pré-infecção no mínimo cinco vezes antes do inóculo.

Da mesma maneira, a análise radiológica foi realizada previamente ao inóculo (mínimo cinco vezes) e constou de radiologias de tórax, esôfago e cólon a fim de determinar os seus padrões normais. O RX de tórax permitiu a avaliação do índice cárdio-torácico (ICT) (Falasca et. al., 1986), seguindo-se a equação:

$$\text{ICT} = \frac{\text{DD} + \text{DE}}{\text{DT}}$$

Onde ICT:

DT (diâmetro do tórax) referente a linha que traça o diâmetro do tórax de uma extremidade a outra,

DD (diâmetro direito) correspondendo ao diâmetro máximo da metade direita do coração e

DE (diâmetro esquerdo) correspondendo ao diâmetro máximo da metade esquerda do coração.

Para o RX do esôfago e cólon, foi necessário o uso de contraste iodado (dose: 20ml, via oral, por animal). Os animais foram mantidos em decúbito dorsal e lateral.

ANEXO 2

Artigos publicados referentes ao histórico clínico do grupo de macacos rhesus estudados no presente trabalho

Artigo 1 - MEIRELLES, M. N. L.; BONECINI-ALMEIDA, M. G.; PESSOA, M. H. R.; GALVÃO-CASTRO, B. *Trypanosoma cruzi*: experimental Chagas' disease in rhesus monkeys. II. Ultrastructural and cytochemical studies of peroxidase and acid phosphatase activities. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1990. 85 (2): 173-181 p.

Artigo 2 - BONECINI-ALMEIDA, Maria da Glória; CASTRO, Bernardo Galvão; PESSOA, Maria H. Ribeiro; PIRMEZ, Claude; LARANJA, Francisco. Experimental Chagas' disease in Rhesus monkeys. I. Clinical, parasitological, hematological and anatomo-pathological studies in the acute and indeterminate phase of the disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1990.85 (2): 163-171.

Artigo 3 - CARVALHO, Cristiano M. Espínola; ANDRADE, Márcia C. R.; XAVIER, Sérgio S.; MANGIA, Regina H.R.;BRITTO, Constança C.; JANSEN, Ana M.; FERNANDES, Octávio F.; VIEIRA, Joseli L.; ALMEIDA, Maria da G. Bonecini. Chronic Chagas disease in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): Evaluation of parasitemia, serology, electrocardiography, echocardiography and radiology. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2003. 68(6): 683-691p.

Estes artigos originais incluídos no presente anexo referem-se ao estudo longitudinal que deu origem, e nos quais foram baseadas, as análises clínicas pós-eutanásia estudadas nesta dissertação. Estão aqui incluídos com a finalidade de facilitar o acompanhamento do perfil clínico dos animais estudados.

EXPERIMENTAL CHAGAS' DISEASE IN RHESUS MONKEYS. I. CLINICAL, PARASITOLOGICAL, HEMATOLOGICAL AND ANATOMO-PATHOLOGICAL STUDIES IN THE ACUTE AND INDETERMINATE PHASE OF THE DISEASE

MARIA DA GLÓRIA BONECINI-ALMEIDA; BERNARDO GALVÃO-CASTRO/*; MARIA HELEOSINA RIBEIRO PESSOA**; CLAUDE PIRMEZ & FRANCISCO LARANJA*

Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Imunologia (WHO Collaborating Center for Research and Training in Parasitic Diseases) *Hospital Evandro Chagas, Caixa Postal 926, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Serviço de Microbiologia e Imunologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Rhesus monkeys (Macaca mulatta) were infected subcutaneously with 1.0×10^4 to 1.5×10^4 metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi (Colombian strain). Parasitological and immunological parameters were evaluated in these animals for periods of 1 month to over 3 years. A chagoma was observed between the 3rd and the 13th day after infection (a. i.) and patent parasitaemia between the 13th and 59th day a. i.. Thereafter, parasites were demonstrated only by haemaculture and/or xenodiagnosis. Circulating specific IgM and IgG antibodies were observed as early as in the 2nd week a. i. IgG levels persisted until the end of the experiment, but IgM antibodies were detectable nine months a. i. Haematological alterations comprised leucocytosis and lymphocytosis. Eletrocardiographic alterations were minor and transient, similar to those observed in non-lethal human acute Chagas' myocarditis. Myocarditis and myositis, characterized by multiple foci of lympho-histiocyte inflammatory infiltrate, were present in monkeys sacrificed on the 41th, 70th and 76th day but not in the animal sacrificed 3 years and 3 months a. i.. The results suggest that Chagas' disease in rhesus monkeys reproduces the acute and indeterminate phases of human Chagas' disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi* – rhesus monkeys – experimental Chagas' disease

Chagas' disease (Chagas, 1909), can manifest itself in a variety of clinical and pathological forms. The acute phase is characterized by high parasitaemia, which usually subsides spontaneously. The indeterminate phase is characterized by an absence of clinical symptoms, sub-patent parasitaemia, and the infection may remain quiescent for many years or decades. A variable percentage of the patients may develop a progressive chronic form which is characterized by myocarditis and/or megaesophagus and/or megacolon.

The difficulty of studying all the aspects of the disease in human beings has led to the search for an adequate experimental model. Various animal species such as mice, dogs and rabbits have been proposed, but differences from human infection were always observed (WHO,

1984). On the other hand, monkeys seem to be a suitable model for the reproduction of human disease (Muniz et al., 1970; Seah et al., 1974; Marsden et al., 1976; Pung et al., 1988 a, b). However, only one kinetic study in *Cebus apella* monkeys has been carried out up to date (Rosner et al., 1988, 1989). The present study was thus performed in order to investigate the kinetics of the acute and indeterminate forms of Chagas' disease in rhesus monkeys.

MATERIALS AND METHODS

Animals: fifteen male *Macaca mulatta*, 4.4 to 10 years old, with 70 to 77 cm of height weighing from 7.2 to 14.3 kg, were purchased from Primatology Center of the Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brasil (Table). The monkeys were maintained under quarantine for 6 months.

Serological tests for Chagas' disease and the PPD skin test (50IU) were negative and no alteration in electrocardiogram (ECG), chest X rays, haematologic analysis and plasma protein concentrations were observed during this period.

This work was partially supported by TDR/OMS T16/181/8B.

+ Corresponding author.

Received September 13, 1989

Accepted May 15, 1990.

TABLE
Experimental Chagas' disease in rhesus monkeys: general data

Monkeys' identification	Age (years)	Body weight (kg)	Inoculum (<i>T. cruzi</i> /kg x 10 ³)	Duration of parasitaemia ^a (days after infection)
1	7.0	10.4	1.4	22-53
2 ^b	10.0	13.3	1.1	20-41
3	6.0	8.7	1.1	17-59
4 ^c	6.0	7.9	1.3	17-59
5	6.0	12.0	1.2	22-37
6 ^b	10.0	14.3	1.0	16-41
7	10.0	12.2	1.2	15-37
8 ^d	4.4	7.2	2.1	13-55
9	5.5	9.0	1.7	18-55
10 ^e	4.4	11.0	1.4	18-53
11	4.5	9.9	1.5	18-55
12	4.6	7.9	1.9	13-55
13	4.5	8.7	1.7	13-55

- a) as detected by direct observation in optical microscopy
 b) sacrificed 41 days after infection (a. i.)
 c) sacrificed 3 years a. i.
 d) sacrificed 70 days a. i.
 e) sacrificed 76 days a. i.

Trypanosoma cruzi and experimental infection: stabulates of blood trypomastigotes of the *T. cruzi* Colombian strain (Federici et al., 1964) were used to infect mice. *Triatoma infestans* were fed on these mice and metacyclic trypomastigotes were obtained from bug urine 30 days afterwards (Lugo, 1973; Zeledon et al., 1979). This process yielded a 98% pure metacyclic trypomastigote preparation, which was used to inoculate 13 monkeys subcutaneously in the antero-lateral face of the arm (1.0×10^4 to 1.5×10^4 trypomastigotes/monkey). The inoculum size/body weight ratios are shown in the Table. Urine from uninfected bugs was injected in the opposite arm as a control. Two monkeys were maintained non-infected as environmental controls and were simultaneously analyzed during the experiment. No significant alterations were detected on these animals with respect to the different tests performed.

Blood samples: blood samples were collected weekly until the 2nd month a. i. and then monthly from the femoral vein. Serum samples were kept at -70°C until use.

All manipulations were done under anesthesia using 10 mg/kg body weight of ketamine chloride (ketalar) and 0.1 ml of a 2% solution of 2-(2.6 xylidino) 5.6 dihydro 4H-13 thiazine (Rompum) intramuscularly.

Parasitaemia: it was measured using the technique described by Hoff (1974). In 3 monkeys (numbers 1, 5 and 6) the quantification of parasite was not done.

Hemoculture: 1.0 ml of blood was added to 6.0 ml of culture medium (BHI – brain heart infusion and LIT – liver infusion tryptose); these cultures were observed weekly during 2 months.

Xenodiagnosis: forty 4th stage nymphs of *Triatoma infestans* were allowed to feed on each monkey; 30 or 60 days after exposure the bugs were dissected and their gut contents microscopically examined (Cerisola et al., 1971).

Electrocardiographic studies: the records were obtained with a direct writing 3 channel Fukuda electrocardiograph (FP31P model) with subcutaneous needles as electrodes. Six extremity leads and 3 or 6 precordial leads were used with the previously anesthetized animal in a dorsal recumbent position. Pre-infection control records were made in every animal. Serial tracings were made at variable intervals a. i., so that a minimum of 8 and maximum of 207 records were obtained from each animal.

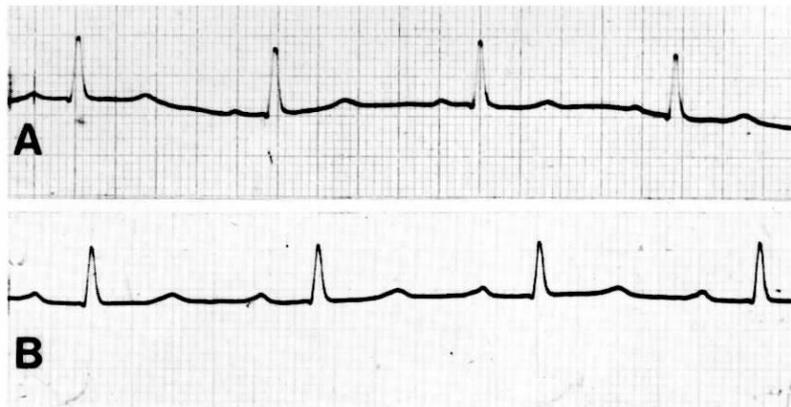


Fig. 1: ECG registered A) before inoculation with *Trypanosoma cruzi* showing normal pattern and B) five weeks after infection showing a first degree atrioventricular block.

Detection of antibodies against T. cruzi and EVI: circulating anti-*Trypanosoma* antibodies were detected by indirect immunofluorescence (IIF) (Camargo & Amato Neto, 1974), using specific fluorescent anti-human IgM and IgG (Cappel Laboratories, USA) and by direct agglutination (DA) using 2-mercaptoethanol (2-ME) treated and non-treated sera (Vattuone & Yvanovsky, 1971). A complement-mediated trypanolytic assay (CoML) was carried out in accordance with the methodology described by Krettli (1982) modified by Romeiro et al. (1984). Antibodies against normal endocardium, blood vessels and interstitium (EVI) were detected as described elsewhere (Cossio et al., 1974).

Anatomo-pathological studies: five animals were sacrificed under anesthesia on the 41st (2 animals), 70th (1 animal) and 76th (1 animal) days a. i. and in 3 years and 3 months a. i. (1 animal) (Table). Samples of each organ were taken and fixed in 10% buffered formalin, paraffin-embedded and stained with haematoxylin-eosin.

Statistical analysis: the Student's t test, corrected for population of unequal variance, was employed.

RESULTS

Clinical aspects and electrocardiographic alterations: during the 1st 3 weeks of infection monkeys were apathetic, with loss of appetite and small loss of weight (mean loss of 6%). In

3 monkeys there was also a small increase in body temperature (of about 1 °C). A chagoma was observed in 9 out of the 13 infected monkeys between the 3rd and 13th day a. i. and disappeared in the majority (7 out of 9) of the animals before the 18th day a. i.. In the other 2 animals the chagoma disappeared on the 20th and 26th day a. i.. The lesion were characterized by an erythema which evolved to a papula. Axillar lymph-nodes were enlarged in all animals. No reaction was observed when only urine from uninfected bugs was injected as control.

ECG disclosed myocardial damage in 9 out of 13 infected monkeys. The abnormalities in all cases were mild and represented by slight degree of auriculo-ventricular conduction disturbance (88.3%), an abnormality of T wave repolarization (77.8%), a decrease in QRS voltage (33.3%) or right bundle branch incomplete block (22.2%). These abnormalities were transient and disappeared at the beginning of the 4th month (Fig. 1).

Parasitaemia and haematological alterations: parasites were detected in the circulating blood between the 13th and 22th days by direct examination (Table). Parasitaemia reached maximum levels between days 27 and 38, being no longer detectable by direct examination after day 59 (Fig. 2). However, the presence of *T. cruzi* in the circulating blood could be demonstrated after that day by hemoculture and/or xenodiagnosis in all animals, in some cases even after 3 years of infection (monkey 4).

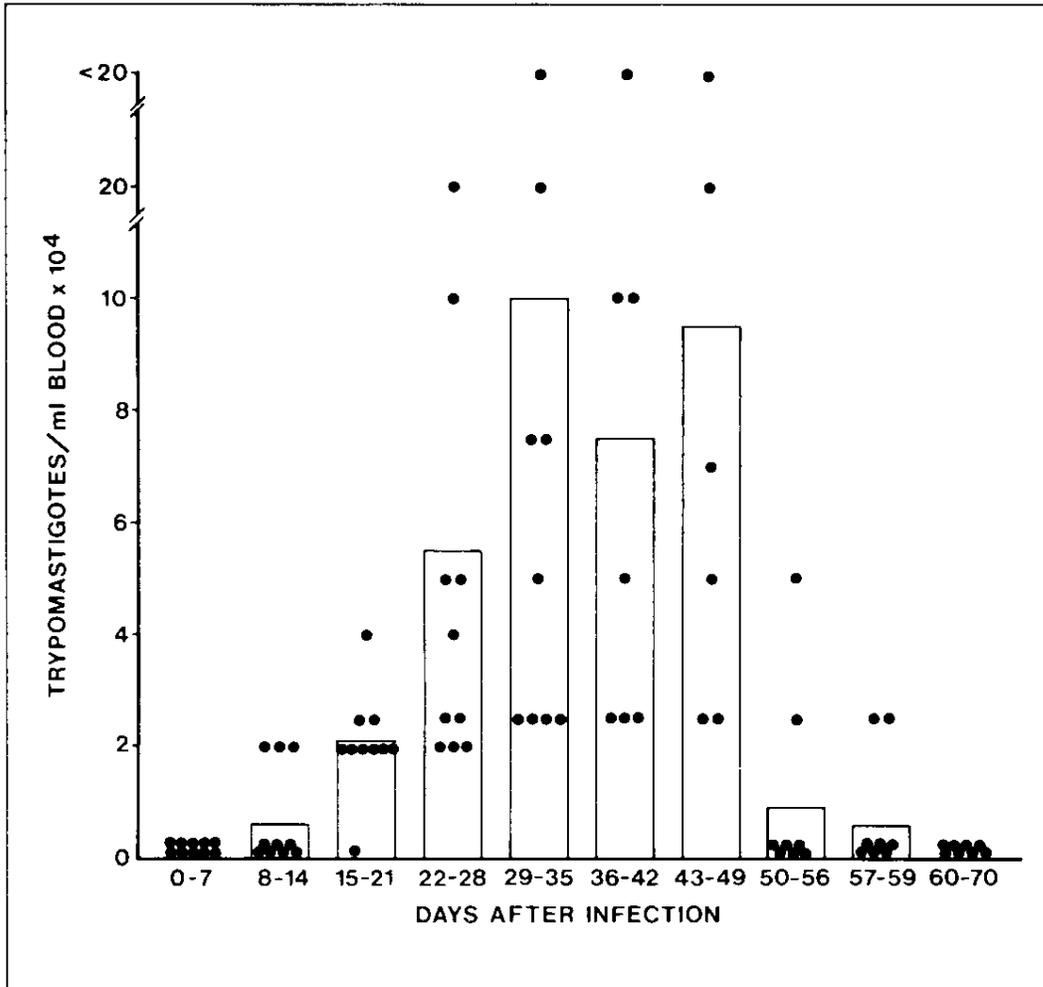


Fig. 2: *Trypanosoma cruzi* parasitaemia in infected rhesus monkeys. Columns represent the mean parasitaemia in each period of time and circles represents individual parasitaemia.

During the acute phase all the monkeys showed a small, but not statistically significant decrease in erythrocyte numbers and haemoglobin levels. Significantly increased numbers of leucocytes and lymphocytes were observed from the 5th week to the 3rd month and 20 days a. i. ($p > 0.05$) reaching maximum numbers in 3 months and 20 days a. i. (Fig. 3). There was a slight increase of monocytes, not statistically significant.

Specific humoral immune response and EVI antibodies: circulating anti-*T. cruzi* antibodies profiles are shown in Fig. 4. Specific IgM and IgG antibodies were first observed by IIF since the 2nd week in 1 out 13 animals and 2 out of

13, respectively. In the 3rd week IgG antibodies were detected in all animals but IgM antibodies were observed in only 8 out of 13 animals. IgM antibodies were present in all animals at the 4th week. However, while these antibodies were no longer detected after the 9th month, the IgG antibodies remained at high levels during all the course of the experiment. Specific antibodies were also detected by agglutination with and without treatment with 2-ME, producing profiles similar of those observed with IIF. Specific lytic antibodies were first detected at the 3rd week, and remained detectable until the end of the experiment in low titers. EVI antibodies were found from the 4th week onwards (with titers ranging from 1:80 to 1:1280).

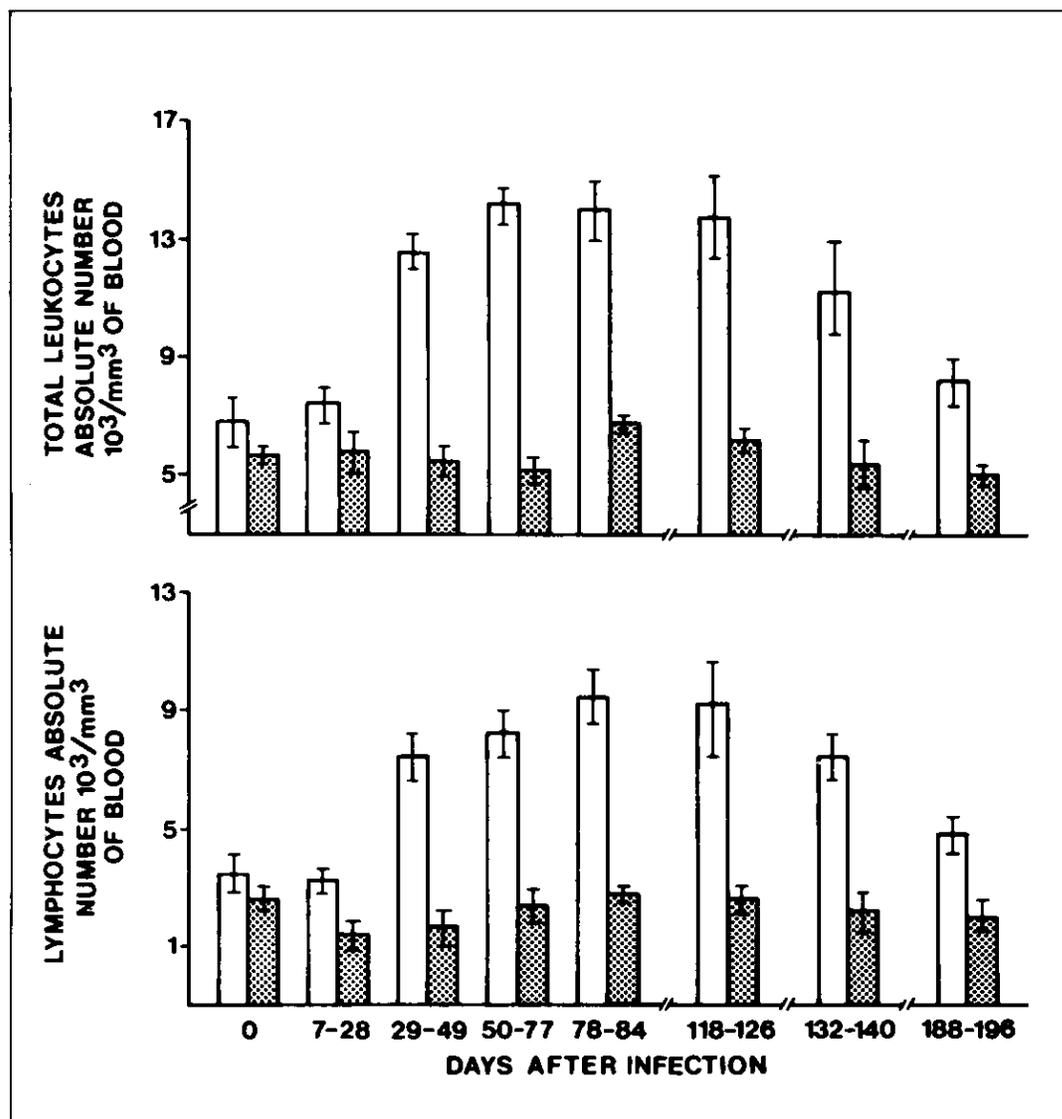


Fig. 3: numbers of leucocytes and lymphocytes in *Trypanosoma cruzi*-infected rhesus monkeys. Open columns represent the mean \pm standard deviation of a minimum of six animals, and hatched columns represent the mean \pm standard deviation of two uninfected animals.

Anatomo-pathological studies: lesions were detected mainly in muscular tissues. Myocarditis and myositis were present in 4 out of 5 of the sacrificed animals, being characterized by multiple foci of lympho-histiocyte inflammatory infiltrate, occasionally associated with fiber destruction (Fig. 5). The inflammatory infiltrate was also found in the muscle layer of the

esophagus, with destruction of muscle fibers and nervous plexuses. Inflammatory reactions were more conspicuous in monkeys which were sacrificed on the 41th and 70th days. Parasitism was more intense in these animals than in those examined later on. In fact, no gross or microscopical alteration was found in the monkey sacrificed 3 years and 3 months a. i..

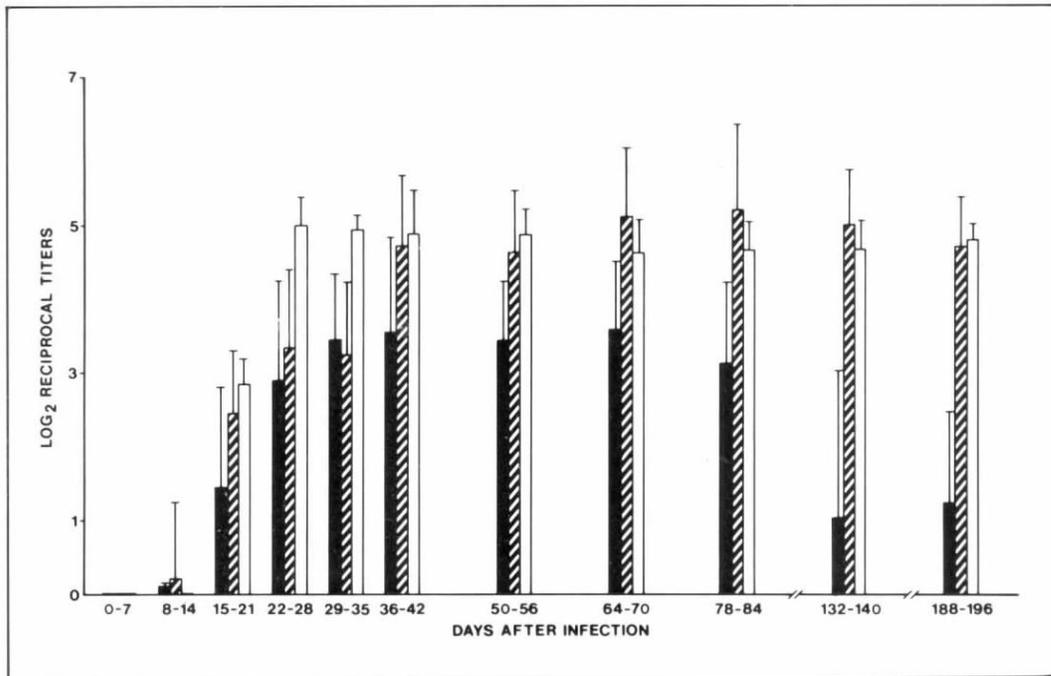


Fig. 4: specific humoral immune response of *Trypanosoma cruzi*-infected rhesus monkeys. Each column represents the mean \pm standard deviation of specific antibody titers detected by immunofluorescence (■ IgM-IIF / ▨ IgG-IIF) and □ complement-mediated trypanolytic assay (CoML).

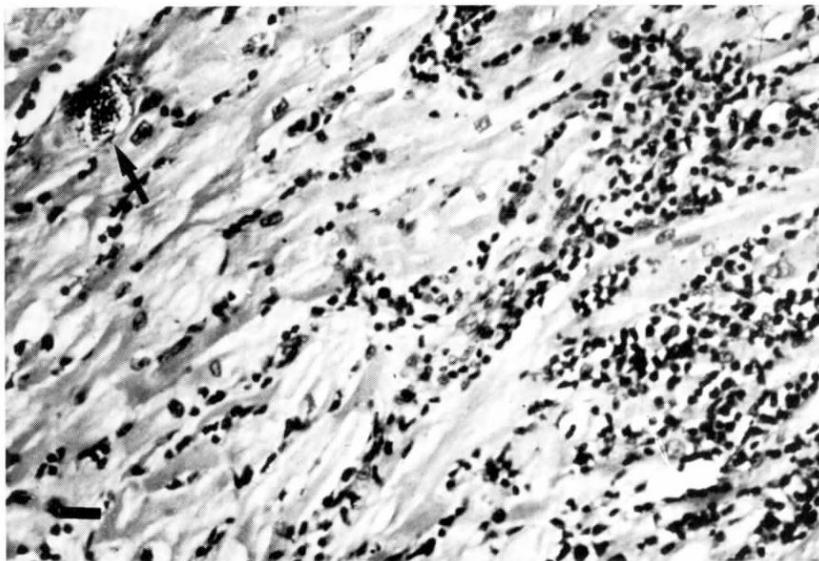


Fig. 5: acute *Trypanosoma cruzi* myocarditis in a monkey 5 weeks after infection. The cellular infiltrate is composed of lymphocytes and macrophages. Arrow indicates nest of amastigotes in muscle fiber. The bar is 10 μ m long.

DISCUSSION

The present data support previous reports that rhesus monkeys experimentally infected with *T. cruzi* reproduce at least the acute and indeterminate phases of human Chagas' disease. Indeed the haematological, eletrocardiographic and histopatological pictures observed in the monkeys studied herein are similar to those reported in human cases of Chagas' disease (Dias, 1912; Mazza & Freire, 1940; Laranja et al., 1949, 1956; Muniz et al., 1970, Seah et al., 1974; Marsden et al., 1976; Miles et al., 1979; OPAS, 1982; Baruffa & Alcantara Filho, 1983).

Although there were individual age and weight variations within the monkeys studied in this work, these variations did not seem to constitute critical factors affecting host-parasite relationship as judged from the parameters studied herein, in as much as there was an homogeneous behaviour of the monkeys in terms of disease progression.

The kinetic study of specific antibodies synthesis was also shown to be similar to that reported for human disease (Krettli, 1982). However, specific IgM was detected for a longer period of time than that usually observed in the acute phase of human disease. The presence of *T. cruzi*-specific IgM could be indicative of recent infection and assays for its detection would therefore be useful as an epidemiological tool as suggested previously (Camargo & Amato Neto, 1974; Schmunis et al., 1980; Amato Neto et al., 1984).

Despite the existence of circulating lytic antibodies in all animals, even in that one monkey with more than 3 years of infection in which no histopathological alterations were observed, parasitaemia was concomitantly detected by xenodiagnosis and/or haemoculture, suggesting the existence of mechanism(s) by which the parasite escapes the lysis *in vivo*. This finding is in accordance with data on human disease in which the detection of lytic antibodies is associated with the presence of the parasite (Krettli, 1982).

Previous studies indicate that there is a great variation in histopathological and eletrocardiographical findings in different species of monkeys infected with *T. cruzi* (WHO, 1984). These differences may be attributed to several

factors. Firstly, it can reflect differences in *T. cruzi* strains and routes of inoculation. Indeed, murine models display histopathological differences when different strains or clones of *T. cruzi* are employed (Andrade, 1974; Postan et al., 1983). On the other hand, studies conducted in rhesus monkey inoculated by different routes showed similar infections as well as similar histopathological findings (Seah et al., 1974; Marsden et al., 1976). Secondly, it may be related to differences in the species of monkeys employed. To clarify this point it would be necessary to perform experiments using different species of monkeys inoculated with the same strain/clone of *T. cruzi*.

Intense inflamatory lesions occur in both acute and chronic phases of Chagas' disease affecting several organs, specially muscle and nervous tissues. The histopathological findings observed in the infected animals agree closely with what has been described in humans (Andrade & Andrade, 1979). Biopsy of the chagoma lesion showed a chronic inflammation which tended to organize a granuloma, as already observed in human chagomas (Mazza et al., 1940; Galvão-Castro et al., 1981; Meirelles et al., 1990). Acute *T. cruzi* meningoencephalitis in the human is usually fatal but of rare occurrence and, so, the degree of central nervous system involvement is not known yet. No anatomopathological alterations related to Chagas' disease in this area was detected.

The pathogenesis of Chagas' disease is still poorly understood but multiple mechanisms may be involved in the passage from the indeterminate to the chronic phase. Since the experimental Chagas' disease in rhesus monkeys seems to reproduce the acute and indeterminate phases of the disease, this model could be useful in solving the intricate puzzle of Chagas' disease pathogenesis, and also in studies in which the induction or acceleration of the development of chronic Chagas' disease could be tried.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Laboratory Dr Bras Miollino for the haematological analysis, Mr Heloisa M. N. Diniz for the photographic work, Mrs Raimunda T. Melo for technical assistance and Dr Lain Ponte de Carvalho for reviewing this manuscript.

REFERENCES

- AMATO-NETO, V.; NAGASSE, T. K.; MOREIRA, A. A. B.; GOMES, A. E. C. & CAMPOS, R., 1984. Utilização, em politransfundidos, da pesquisa de anticorpos IgM anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Toxoplasma gondii* para detectar infecções pós transfusionais recentes. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 26: 83-86.
- ANDRADE, S. G., 1974. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* no Recôncavo baiano. Contribuição ao estudo da patogenia geral da doença de Chagas em nosso meio. *Rev. Pat. Trop.*, 3: 65-121.
- ANDRADE, Z. A. & ANDRADE, S. G., 1979. Patologia, p. 199-248. In: Z. Brener & Z. A. Andrade, (ed.) *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- BARUFFA, G. & ALCANTARA-FILHO, A., 1983. Forma aguda da doença de Chagas no Rio Grande do Sul - Aspectos Laboratoriais. *Rev. Goiana Med.*, 29: 9-15.
- CAMARGO, M. E. & AMATO-NETO, V., 1974. Anti-*Trypanosoma cruzi* IgM antibodies as serological evidence of recent infection. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 16: 200-202.
- CERISOLA, J. A.; ROHEDDER, R. & PRADO, C. F., 1971. Rendimiento del xenodiagnostico en la infección chagásica humana utilizando ninfas de diferentes especies de triatominos. *N. Chile Parasitol.*, 26: 57.
- CHAGAS, C., 1909. Nova Trypanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo do *Schizopypanum cruzi*, n. gen., n. sp. agente etiológico de uma nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1: 158-218.
- COSSIO, P. M.; DIEZ, C.; SZARFMANN, A.; KREUTZER, E.; CANDIOLO, B. & ARANA, R. M., 1974. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor with reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, 49: 13-21.
- DIAS, E., 1912. Moléstia de Carlos Chagas. Estudos hematológicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 4: 34-61.
- FEDERICI, E. E.; ABELMANN, W. H. & NEVA, F. A., 1964. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 13: 272-280.
- GALVÃO-CASTRO, B.; GRIMALDI, G. JR; de OLIVEIRA-NETO, M. P. & DEANE, L. M., 1981. *Trypanosoma cruzi* em *Macaca mulatta* Estudo morfológico da infecção ao nível da porta de entrada. XI Reunião Anual em Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu, MG, Brasil, p. 53.
- HOFF, R., 1974. A method for counting and concentrating living *Trypanosoma cruzi* in blood lysed with ammonium chloride. *J. Parasitol.*, 60: 527-528.
- KRETTLI, A. U., 1982. Antibodies to *Trypanosoma cruzi* in experimental and human infections. *Afr. Clin. Exp. Immunol.*, 3: 327-345.
- LARANJA, I. S.; DIAS, E. & NOBREGA, G., 1949. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 46: 473-529.
- LARANJA, F. S.; DIAS, E.; NOBREGA, G. & MIRANDA, A., 1956. Chagas' Disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation*, 15: 1035-1059.
- LUGO, A., 1973. Influencia de la ruta de inoculation de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* sobre el desarrollo de la parasitemia em ratones albinos y alopecicos. Curso de Post-grado de Parasitemia. Enfermedad de Chagas. Merida, Venezuela: Talleres graficos Universitarias, Universidad de Los Andes.
- MARSDEN, P. D.; SEACH, S. K. K.; DRAPER, C. C.; PETITT, L. E.; MILLES, M. A. & VOLLER, A., 1976. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in Rhesus monkeys. II. The early chronic phase. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 70: 247-251.
- MAZZA, S. & FREIRE, R. S., 1940. Manifestaciones cutaneas de inoculacion metastaticas y hematogenas en enfermedad de Chagas. *Public. MEPR*, 46: 3-38.
- MEIRELLES, M. N. L.; BONECINI-ALMEIDA, M. G.; PESSOA, M. H. R. & GALVÃO-CASTRO, B., 1990. *Trypanosoma cruzi*: Experimental Chagas' disease in rhesus monkeys II. Ultrastructural and Cytochemical studies of peroxidase and acid phosphatase activities. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85: 528-532.
- MILES, M. A.; MARSDEN, P. D.; PETTITT, L. E.; DRAPER, C. C.; WATSON, S.; SEACH, S. K. K.; HUTT, M. S. R. & FOWLER, J. M., 1979. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in Rhesus monkeys. III Electrocardiographic and histopathological findings. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 73: 528-532.
- MUNIZ, J.; SOARES, R. R. L.; SOUZA, M. A. & QUINTAO, L. G., 1970. Trypanosomiase americana (Doença de Chagas) dentro dos conceitos da imunopatologia. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.*, 22: 355-410.
- OPAS, 1982. Enfermedad de Chagas. *Bol. Epidemiol.*, 3: 1-6.
- POSTAN, M.; DVORAK, J. A. & Mc DANIEL, J. P., 1983. *Trypanosoma cruzi*: A comparative study on the course of infection of inbred mice with two clones isolated from a common source. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32: 497-506.
- PUNG, O. J.; HULSEBOS, L. H. & KUHN, R. E., 1988a. Experimental Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi*) in the Brazilian squirrel (*Saimiri sciureus*): Hematology, Cardiology, Cellular and Humoral Immune Responses. *Int. J. Parasitol.*, 18: 115-120.
- PUNG, O. J.; HULSEBOS, L. H. & KUHN, R. E., 1988b. Experimental leishmaniose and Chagas' disease in the Brazilian squirrel monkey: Cross immunity and electrocardiographic studies of monkeys infected with *Leishmania braziliensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.*, 18: 1953-2059.
- ROMEIRO, S. A.; TAKEHARA, H. & MOTA, I., 1984. Isotype of lytic antibodies in serum of Chagas' disease patients. *Clin. Exp. Immunol.*, 55: 413-418.
- ROSNER, J. M.; SHININI, A.; ROVIRA, T.; DE ARIAS, A.; VELASQUEZ, G.; IDALIA-MONZON, M.; MALDONADO, M.; FERRO, E. A. & GALEANO, R., 1988. Acute Chagas' disease in non-human primates. I- Chronology of parasitemia and immunological parameters in the *Cebus apella* monkey. *Trop. Med. Parasitol.*, 39: 51-55.
- ROSNER, J. M.; BELASSAI, J.; SCHININI, R. T.; DE ARIAS, A. R.; FERRO, E. A.; FERREIRA, E.; VELASQUEZ, G.; MONZON, M. I.; MALDONADO, M.; GALEANO, M. & FRESCO, M. A., 1989.

- Cardiomyopathy in *Cebus apella* monkeys experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Trop. Med. Parasitol.*, 40: 24-31.
- SCHMUNIS, G. A.; SZARFMAN, A.; COARASA, L.; GUILLERON, C. & PERALTA, J. M., 1980. Anti-*Trypanosoma cruzi* agglutinins in acute human Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29: 170-178.
- SEAH, S. K. K.; MARSDEN, P. D.; VOLLER, A. & PETTITT, L. E., 1974. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in Rhesus monkeys – The acute phase. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 68: 63-69.
- VATUONE, N. H. & YANOVSKY, J. F. 1971. *Trypanosoma cruzi** agglutination activity of enzyme-treated epimastigotes. *Exp. Parasitol.*, 30: 349-355.
- WHO, 1984. *Report of the Scientific working group on the development and evaluation of animal models for Chagas' Disease*. Geneva.
- ZELEDON, R., ALVARENGA, N. J. & SCHOSINS-TRY, A., 1979. Ecology of *Trypanosoma cruzi* in the insect, p. 59-70. In *Proceedings of International Symposium on Chagas' disease*. New York: Pan American Health Organization.

TRYPANOSOMA CRUZI: EXPERIMENTAL CHAGAS' DISEASE IN RHESUS MONKEYS. II. ULTRASTRUCTURAL AND CYTOCHEMICAL STUDIES OF PEROXIDASE AND ACID PHOSPHATASE ACTIVITIES

MARIA DE NAZARETH LEAL DE MEIRELLES/*; MARIA DA GLÓRIA BONECINI-ALMEIDA*;
MARIA HELEOSINA RIBEIRO PESSOA** & BERNARDO GALVÃO-CASTRO*

Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Ultraestrutura e Biologia Celular *Departamento de Imunologia
(WIO Collaborating Center for Research and Training in Parasitic Disease) Caixa Postal 926, 20001
Rio de Janeiro, RJ, Brasil **Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Serviço de Microbiologia e Imunologia,
Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Ultrastructural and cytochemical studies of peroxidase and acid phosphatase were performed in skin, lymph node and heart muscle tissue of rhesus monkeys with experimental Chagas' disease. At the site of inoculation there was a proliferative reaction with the presence of immature macrophages revealed by peroxidase technique. At the lymph node a diffuse inflammatory exudate with mononuclear cells, fibroblasts and immature activated macrophages reproduces the human pattern of acute Chagas' disease inflammatory lesions. The heart muscle cells present different degrees of degenerative alterations and a striking increase in the number of lysosomal profiles that exhibit acid hydrolase reaction product. A strong inflammatory reaction was present due to lymphocytic infiltrate or due to eosinophil granulocytes associated to ruptured cells. The present study provides some experimental evidences that the monkey model could be used as a reliable model to characterize histopathological alterations of the human disease.

Key words: ultrastructural cytochemistry – peroxidase activity – acid phosphatase – Chagas' disease – rhesus monkeys

Several experimental models have been tested with the purpose to obtain a reliable reproduction of human Chagas' disease. The majority of these models only reproduces one of the described stages of the disease (WHO, 1984; Andrade & Grimaud, 1986; Brener & Ramirez, 1985).

Many lines of evidence indicate that non-human primates are suitable model for Chagas' disease. Studies with these animals were performed using a species of the genus *Cebus* as well as squirrel monkeys (Magarino Torres & Tavares, 1958; Bołomo et al., 1980; Rosner et al., 1988; Pung et al., 1988). Recently it was possible to confirm that rhesus monkeys reproduce at least the acute and indeterminate phase of the disease (Guimarães & Miranda, 1961; Marsden et al., 1976; Seah et al., 1974; Bonecini-Almeida et al., 1990).

In this paper we analyse the ultrastructural cytochemistry alterations by observing mainly peroxidase and acid phosphatase activities of the lesions in the skin at the site of inoculation, the drainage lymph node and heart muscle tissue.

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental infection – Five rhesus monkeys experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* (Colombiana strain) were sacrificed at five, ten and eleven weeks after infection. Heart tissues were taken for ultrastructural studies. Biopsies of the site of inoculation in skin (Chagoma) and lymph node both taken on the 13th day after infection were also analysed. Details of the experimental infection are to be found in the previous paper (Bonecini-Almeida et al., 1990).

Transmission electron microscopy – Small pieces (1 mm) of skin, lymph node and heart muscle (atria and ventricles) were fixed either in 2,5% GA or 1% PFA plus 1% GA in 0,1M Na cacodylate buffer, pH 7.2 for 1 hour or 30 min,

This work received support from FINEP (PINF I) and CNPq.

* Corresponding author.

Received September 13, 1989.

Accepted January 4, 1990.

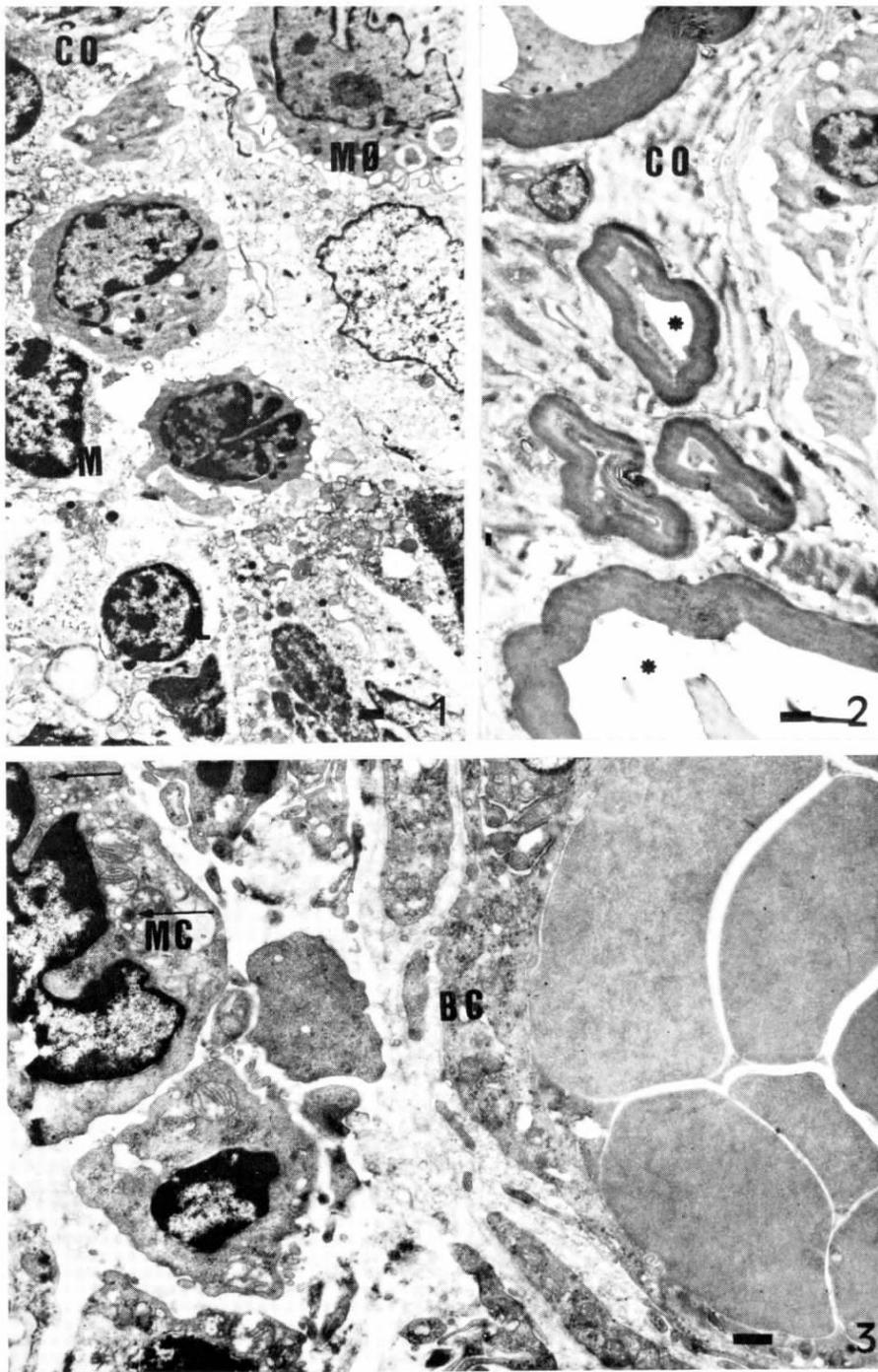


Fig. 1: general view of skin lesion 3 days old showing an inflammatory infiltrate of mononuclear cells with predominance of lymphocytes (L), monocytes (M) and macrophages (MO). Fig. 2: nerve sections show a pattern of disorganization in the myelinated fibers and a pronounced retraction in the axone (*) Collagen deposits are seen in close proximity (CD). Fig. 3: congested blood capillary (BC) cells present the luminal space filled with erythrocytes (E) and monocytes. Mononuclear cells show peroxidase positive granules in the cytoplasm (MC). All bars are 0.5 μ m.

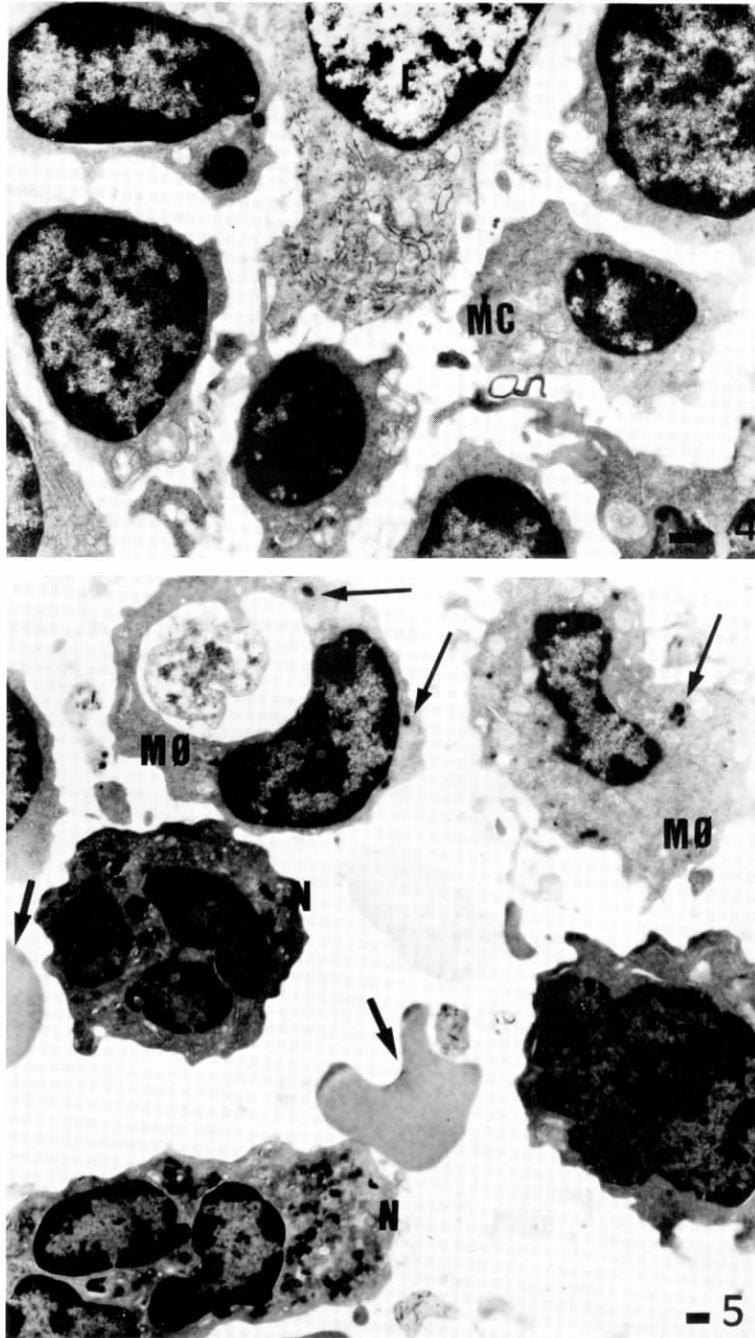


Fig. 4: lymphonode with mononuclear cells (MC); fibroblasts with enlarged endoplasmatic reticulum (F). Fig. 5: lymphonode showing the presence of large number of neutrophils (N) with their characteristics granules, activated macrophages (MO) and a pronounced extravasation of red cells (arrow).

respectively, and rinsed in the same buffer. Then they were post-fixed with 1% OsO₄. dehydrated in acetone and embedded in Epon.

Section were observed either unstained or stained with uranyl acetate and lead nitrate, in a EM 10B Zeiss Microscope.

Ultrastructural cytochemistry – Horseradish peroxidase (E. C. 1.11.1.7.) – For ultrastructural studies, the small pieces of tissue were incubated in the presence of 2 mg/ml HRP (Sigma, type II) for 2 h at 37 °C, followed by a rinsage with PBS, and fixation in 2,5% GA on 0,1 M Na cacodylate buffer pH 7.2, and another rinsage and then left overnight at 4 °C. The material was incubated for 30 min at room temperature in a medium containing 3,3'-diaminobenzidine (0,5 mg/ml) in 0,05 M Tris hydroxymethyl aminomethane-HCl buffer pH 7.6 and 0,01% H₂O₂, for detection of peroxidase activity (Graham & Karnovsky, 1966) and processed for routine electron microscopy.

Acid Phosphatase (E. C. 3.1.3.2.) – For localization of the lysosomal enzyme acid phosphatase, small pieces of heart (atria and ventricles) were fixed with 1% PFA plus 1% GA for 30 min at 4 °C, washed with Na cacodylate buffer pH 7.2 and incubated in the medium described by Rytters & Bowers (1976) as follows: 0,05 M calcium chloride, 11,5 mM Na B-glycerophosphate, 1 mM cerium chloride in Tris-Maleate buffer pH 5.0 and also processed for routine EM. The controls, were performed incubating the material in a medium: (a) without the substrate or (b) containing 10 mM NaF.

RESULTS

Skin biopsies – The examination of skin lesions biopsies 13 days old, showed a considerable oedema and a proliferative reaction with the presence of an inflammatory infiltrate of mononuclear cells, mostly lymphocytes, monocytes and macrophages (Fig. 1). Nerve sections exhibited alterations with a pattern of disorganization of the myelinated fibers and axon retraction. Collagen deposits were present (Fig. 2). Endothelial cells were enlarged, blood capillaries were congested and filled with red blood cells. Monocytes present at the skin lesions showed positive peroxidase reaction (Fig. 3).

Lymphonode – The fragments of lymph node examined with 13 days of infection showed an inflammatory infiltration with predominance of lymphocytes, monocytes, macrophages, fibroblasts and collagen deposits. Macrophages with signs of activation and peroxidase positive granules were seen. Neutrophils were abundant and a pronounced extravasation of red blood cells was seen (Figs 4, 5).

No parasites were detected in the lymph node examined.

Heart muscle tissue – Heart tissue from four monkeys at different times of infection was examined. They were sacrificed with five, ten and eleven weeks of infection. In all of them a common inflammatory response due to an infiltrate of mononuclear cells specially lymphocytes and macrophages was seen. Dissociation of the basal membrane and abundant collagen deposits were also observed (Fig. 6). Different grades of dissociation of fibers were noted and an increase in the lysosomal granules with a positive reaction for acid phosphatase was observed both in preserved and in well damaged cells (Figs 7, 8). In one of the monkeys examined, with ten weeks of infection, a pronounced bulgy sarcolemma both in the left atria and ventricle was noticed (Fig. 7). Sometimes two well preserved and very closely located cells, one with parasites and the other full with acid phosphatase reactive lysosomes could be seen (data not shown). A lymphocyte infiltration was seen in the heart muscle cells in the majority of the monkeys studied showing different grades of damage as swelling of mitochondria, dilated T tubules, acid phosphatase reactive lysosomes, bulgy sarcolemma (Figs 8, 9). In a sample from a monkey examined with five weeks of infection an aggressive reaction to heart muscle fibers was seen due to a pronounced association of eosinophils with the heart muscle fibers (Fig. 10). Well preserved *T. cruzi* infected fibers were seen at the left atria. Many sealed vesicles were observed around the parasite (Fig. 11). A common pattern was the looseness of the junctions at the intercalated disk seen in non parasitized but well damaged cells (Fig. 12). No reaction product was observed in a medium without substrate or containing 10 mM NaF (data not shown).

DISCUSSION

The difficulties of finding a reliable animal model that allows to follow the time course of the human Chagas' disease represent a great problem in the knowledge of the immunopathological evolution of this disease. Controlled conditions and systematic studies in such a model would clarify some questions related with the immunological early events that may be responsible for initiating the lesions in man or the mechanism of heart damage in chronic human disease.

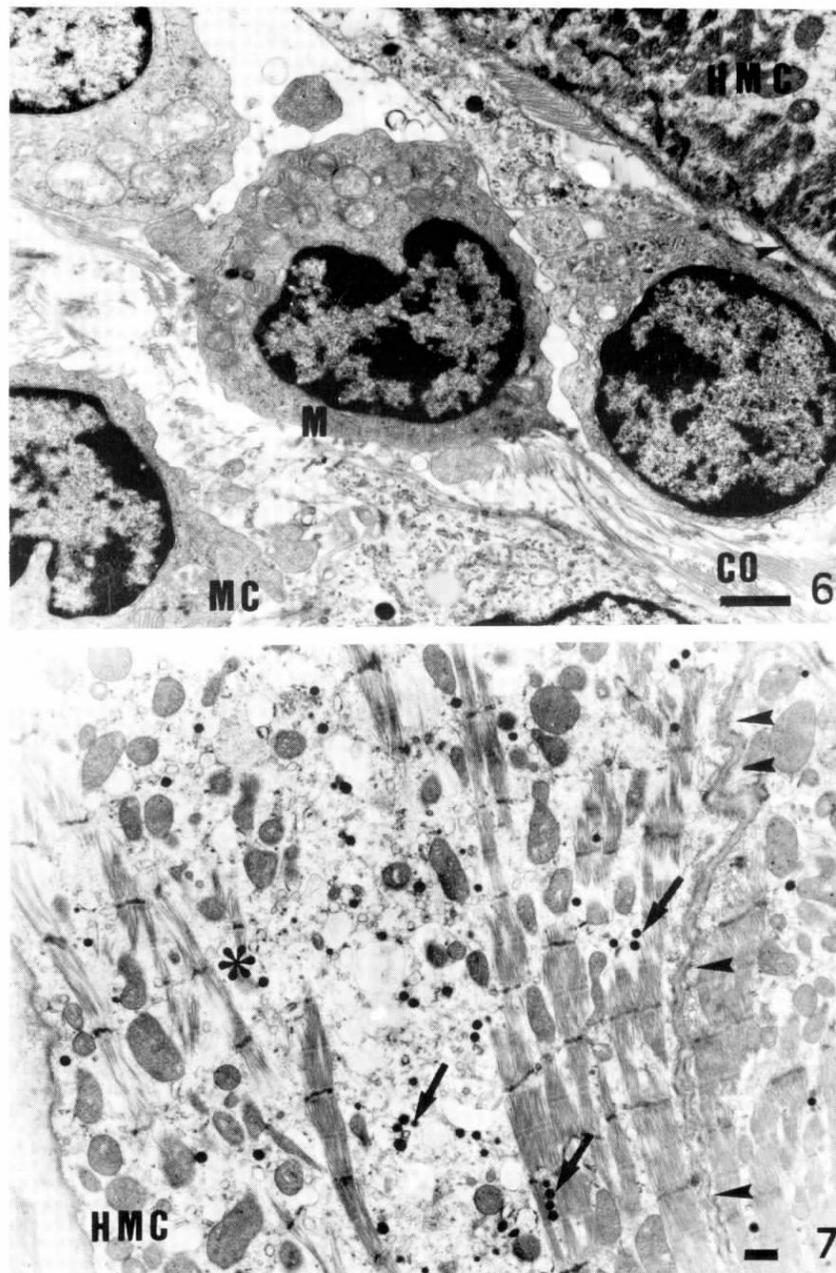
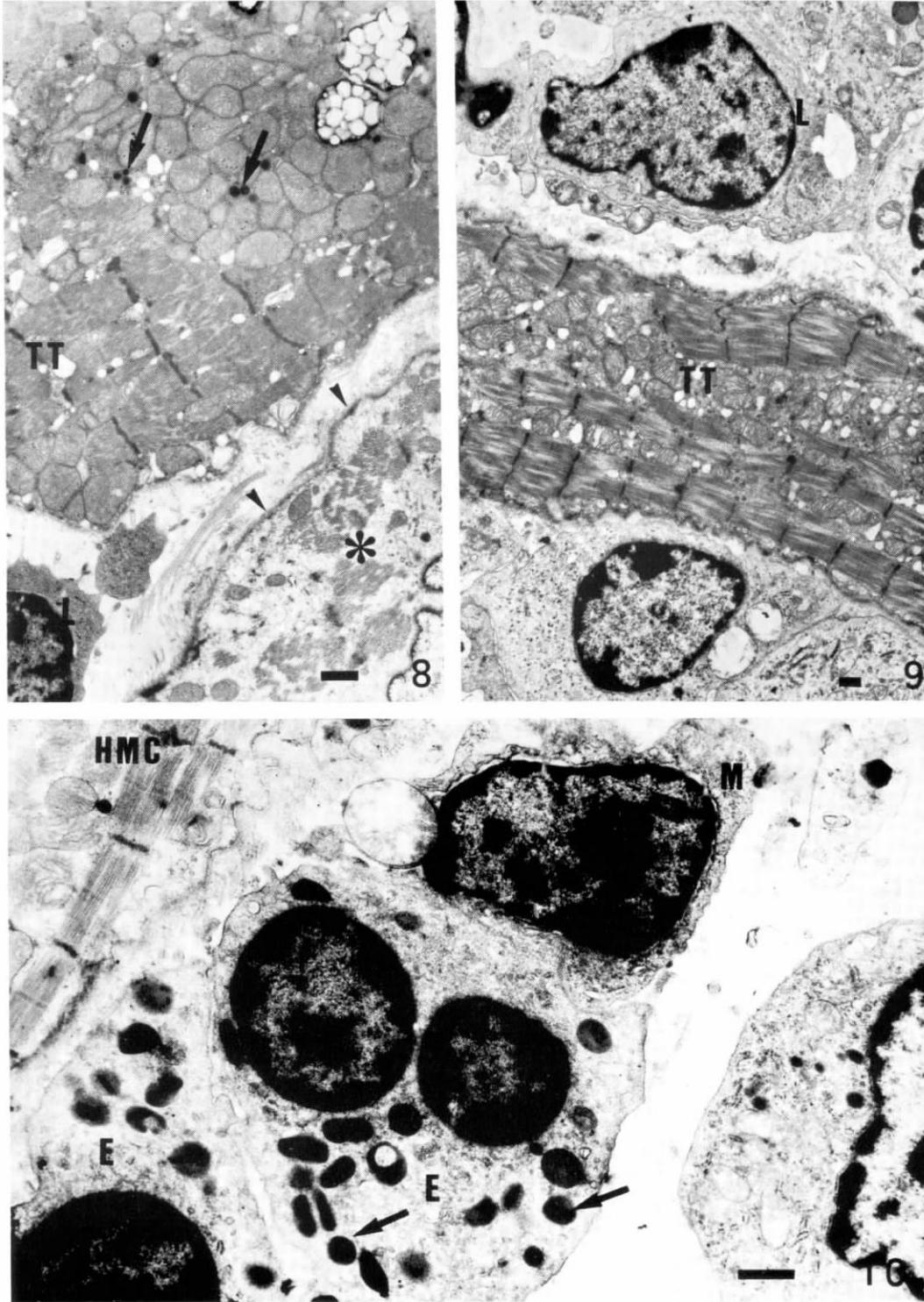


Fig. 6: damaged heart muscle cells (HMC) show an infiltrate of mononuclear cells (MC) with predominance of lymphocytes and monocytes. Dissociation of basal membrane (BM) and abundant collagen (CO) are a common feature. Fig. 7: localization of acid phosphatase in lysosomal profiles (arrows) in well damaged cells with an extensive oedema, bulgy sarcolemme (arrow head) and dissociated myofibers (*).

The study of experimental Chagas' disease in different animals models has pointed to the difficulty in following the evolution of the intermediate and chronic phases in regard to their parasitological and immunological charac-

terists. This is due to the insufficient data available or to experimental conditions that allow the survival of the inoculated animals (Brener & Ramirez, 1985).



Figs 8-9: severe aggressive reaction is seen in the monkey heart muscle cells: a lymphocyte infiltration in the proximity of cells that display great dissociation of the myofibers (*), swollen T- Tubules (TT), bulgy sarcolem (→) Reactive acid phosphatase lysosomal profiles (arrow). Fig. 10: eosinophils (E) with characteristic granules (arrow) are seen associated with heart muscle fibers and with monocytes (M).

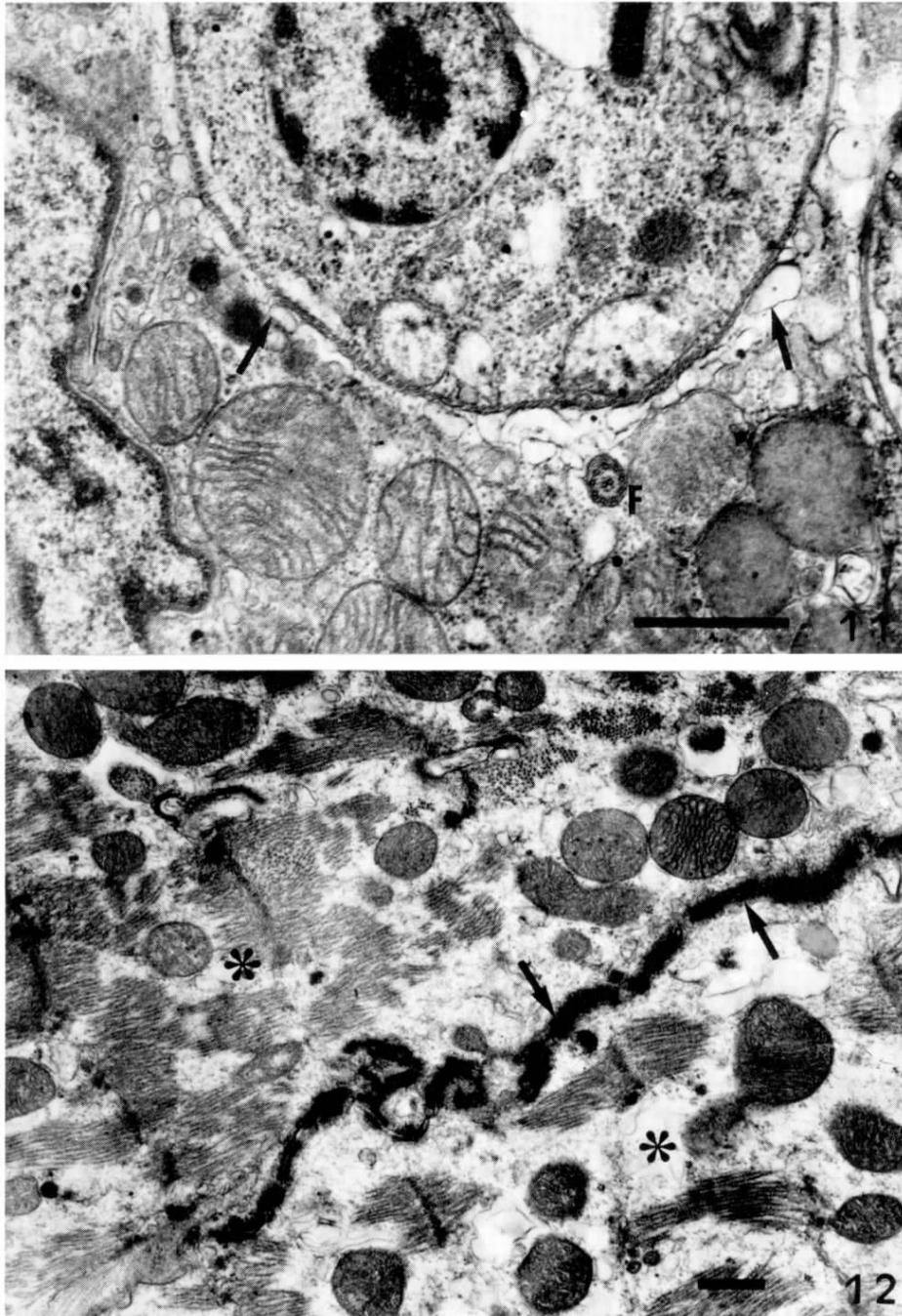


Fig. 11: left atria of heart muscle cell infected with *Trypanosoma cruzi*. Small vesicles are seen around the parasite (arrow), flagella of the parasite (F). Fig. 12: damaged cells without the presence of parasites show signs of looseness of the junctions (arrows), dilated mitochondria, oedema and great disorganization of myofibrils (*).

Our previous report, (Bonecini-Almeida et al., 1990) points clearly that the rhesus monkey experimentally infected with *T. cruzi* reproduces the acute and intermediate stages of the human

Chagas' disease. As now stated many similarities were found at the site of inoculation, patent parasitaemia, pronounced lymphocytosis, electrocardiographical and histopathological alter-

ations, hematological parameters, as well as the detection of *T. cruzi* antibodies, that resemble the human pattern.

An intense parasitism was observed in human heart muscle cells followed by focal inflammation after the rupture of the fibers (Vianna, 1911). The inflammatory exudate is constituted mainly by mononuclear cells, specially macrophages, lymphocytes and few plasma cells. This response causes dissociation of the muscle cells, pushing apart the myofibrils and other organelles leading to many degenerative changes (Tafuri, 1985; Andrade, 1983). In systems *in vitro* factors as the one related with the parasite or related with the host may influence the acute myocarditis pattern.

There are few reports concerning the early events of the interaction and local changes that follow the infection of *T. cruzi* in mammalian hosts. A recent report (Bijovsky & Milder, 1988) about the inoculation of the parasites in a peculiar region devoid of lymphatic vessels – the cheekpouch of hamsters – showed the persistence of parasites until 15-20 days after inoculation followed by their disappearance of this local around 28 days with the presence of an infiltrate of mononuclear cells, plasmocytes and macrophages.

In the present paper, examination at the site of inoculation showed a proliferative reaction with the presence of lymphocytes, activated fibroblasts, eosinophil granulocytes and immature macrophages revealed by peroxidase technique. In addition, oedema alterations in the myelinated axones and congested blood vessels were observed. The finding of a positive reaction in the granules of some mononuclear cells at the skin of the rhesus monkeys correlates with the pattern of cell-mediated immune response in this local.

At the lymph node a diffuse inflammatory exudate of monocytes and lymphocytes, as well as fibroblast with dilatated endoplasmic reticulum, neutrophil granulocytes, rare mastocytes were seen. Oedema and immature activated macrophages with peroxidase positive granules were present, data that reproduce the human pattern of acute Chagas' disease inflammatory lesions.

The present study demonstrates that heart muscle cells could be seen with different degrees

of degenerative signs showing electron microscopic alterations that resemble the signs of damage of a severe myocarditis pattern. A strong inflammatory reaction was present due to lymphocytic infiltrate that was seen at very close proximity of the fibers, in most of cases, or due to eosinophil granulocytes associated to the ruptured cells suggesting a role of the immune response in the reaction. Both aspects are already described in the literature for the human disease (Tafuri, 1985). In some cases, in left atria, we observed parasites free in the cytoplasm of well preserved cells, surrounded by abundant sealed vesicles. These signs could be an end product of the lysis of the endocytic vacuole where the parasite could be initially found, as previously demonstrated in *in vitro* muscle culture systems (Meirelles et al., 1986). *In vitro* systems of both macrophages and heart muscle cells showed clearly the initial events of the interiorization of *T. cruzi* revealing the presence of the parasite within the phagosome immediately after its interiorization (Meirelles et al., 1986; Nogueira & Cohn, 1976). Sometimes normal fibers with an increase of lysosomal profiles were seen near infected cells with no signs of damage. We noticed a striking increase in the number of lysosomal profiles that exhibit acid hydrolase reaction products in heart tissue. It is interesting that the increase in the lysosomal granules were seen in cells without parasites, both with normal aspect and with graded signs of disturbance. There are some experimental evidences (Decker & Wildenthal, 1978; Decker et al., 1980) supporting the hypothesis that lysosomal changes may somehow be linked to the damage sustained by the cells during certain disease. An important field of research in the monkey model will be the search of the role of lysosomal hydrolases in producing tissue damage and contributing to the cellular alterations that accompanies cell death.

The present study provides some experimental evidences that the monkey model, like the human being, develops, a serie of sequential alterations that resemble the morphological signs of the Chagas' disease and could be used within well controlled conditions as a reliable model to characterize the human disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Mr Levi Marques da Silva, Mr General Luciano Baptista, the Setor of Multi-Meios

(FIOCRUZ) for the technical assistance and to the secretarial assistance of Mrs Maria José Couto.

REFERENCES

- ANDRADE, S. G. & GRIMAUD, J. A., 1986. Chronic murine myocarditis due to *Trypanosoma cruzi*. An ultrastructural study and immunochemical characterization of cardiac interstitial matrix. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81: 29-41.
- ANDRADE, Z. A., 1983. Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. In *Cytopathology of parasitic diseases*. Ciba Found. Symp., 99: 214-233.
- BIJOVSKY, A. T. & MILDNER, R., 1988. Ultrastructural analysis of the interaction between host cells and *Trypanosoma cruzi* in experimental chagomas. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82: 704-708.
- BOLOMO, N.; MILEI, J.; COSSIO, P. M.; SEGURA, E. L.; LAGUENS, R. P.; FERNANDEZ, L. M. & ARAÑA, R. M., 1980. Experimental Chagas' disease in a South America primate (*Cebus* sp). *Medicina* (Buenos Aires), 40: 667-672.
- BONECINI-ALMEIDA, M. G.; PESSOA, M. H. R.; PIRMEZ, C.; LARANJA, F. & GALVÃO-CASTRO, B., 1990. *Trypanosoma cruzi*: experimental Chagas' disease in rhesus monkeys. I. Clinical, parasitological, haematological and anatomopathological studies in the acute and indeterminate phases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85:
- BRENER, Z. & RAMIREZ, L. E., 1985. Modelo Cronico da Doença de Chagas Experimental. In R. Cançado & M. Chuster, *Cardiopatía Chagásica* (Cap. III) Fundação Carlos Chagas, Belo Horizonte, MG, Brasil.
- DECKER, R. S.; CRIE, J. S.; POOLE, A. R.; DINGLE, J. T. & WILDENTHAL, K., 1980. Resistance to ischemic damage in hearts of starved rabbits. Correlation with lysosomal alterations and delayed release of cathepsin. *D. Lab. Invest.*, 43: 197-207.
- DECKER, R. S. & WILDENTHAL, K., 1978. Sequential lysosomal alterations during cardiac ischemia. II. Ultrastructural and Cytochemical changes. *Lab. Invest.*, 38: 662-673.
- GRAHAM, R. C. & KARNOVSKY, M. J., 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14: 291-302.
- GUIMARÃES, J. P. & MIRANDA, A., 1961. Megaesôfago em macaco Rhesus com 10 anos de infecção chagásica. *Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas*, Rio de Janeiro, 2: 562-571.
- MAGARINO TORRES, C. & TAVARES, B. M., 1958. Miocardite no macaco *Cebus* após inoculações repetidas com *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 56: 85-152.
- MARSDEN, P. D.; SEAH, S. K. K.; DRAPPER, C. C.; PETTIT, L. E.; MILES, M. A. & VOLLER, A., 1976. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in Rhesus monkey. II. The early chronic phase. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 70: 247-251.
- MEIRELLES, M. N. M., ARAUJO JORGE, T. C., MIRANDA, C. F.; DE SOUZA, W. & BARBOSA, H. S., 1986. On the interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cell: Ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis *in vitro*. *Eur. J. Cell. Biol.*, 41: 198-205.
- NOGUEIRA, N. & COHN, Z., 1976. *Trypanosoma cruzi*: mechanisms of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.*, 143: 1402-1420.
- PUNG, O. J.; HULSEBOS, L. H. & KUHN, R. E., 1988. Experimental Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi*) in the Brazilian squirrel (*Saimiri sciurus*): Hematology, Cardiology, Cellular and Humoral immune Response. *Int. J. Parasitol.*, 18: 115-120.
- ROSNER, J. M.; SCHININI, A.; ROVIRA, T.; VELASQUES, G.; MONZÓN, M. I.; MALDONADO, M.; FERRO, E. A. & GALEANO, R., 1988. Acute Chagas' Disease in non-human primates. I. Chronology of clinical events, clinical chemistry, ECG, radiology, parasitemia and immunological parameters in the *Cebus apella* monkey. *Trop. Med. Parasitol.*, 39: 51-55.
- RYTERS, A. & BOWERS, B., 1976. Localization of acid phosphatase in *Acanthamoeba castellanii* with light and electron microscopy during growth and after phagocytosis. *J. Ultrastruct. Res.*, 57: 309-321.
- SEAH, S. K. K.; MARSDEN, P. D.; VOLLER, A. & PETTIT, L. E., 1974. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in Rhesus monkeys. The acute phase. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 68: 63-69.
- TAUFURI, W. L., 1985. Patogênese. In R. Cançado & M. Chuster, *Cardiopatía Chagásica* (cap I). Fundação Carlos Chagas, Belo Horizonte, MG, Brasil.
- VIANNA, G., 1911. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da moléstia de Carlos Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 3: 272-294.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1984. Report of the Scientific Working Group on the development and evaluation of animal models for Chagas' Disease. Genève, July, p. 23-24. *TDR/IMMCHA-AMDD/84.3*.

CHRONIC CHAGAS' DISEASE IN RHESUS MONKEYS (*MACACA MULATTA*): EVALUATION OF PARASITEMIA, SEROLOGY, ELECTROCARDIOGRAPHY, ECHOCARDIOGRAPHY, AND RADIOLOGY

CRISTIANO MARCELO ESPINOLA CARVALHO, MÁRCIA CRISTINA RIBEIRO ANDRADE,
SÉRGIO SALLES XAVIER, REGINA HELENA RICCIOPPO MANGIA, CONSTANÇA CARVALHO BRITTO,
ANA MARIA JANSEN, OCTAVIO FERNANDES, JOSELI LANNES-VIEIRA, AND
MARIA DA GLÓRIA BONECINI-ALMEIDA

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Departamento de Especialidades Médicas, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; Departamento de Primatologia, Centro de Criação de Animais de Laboratório, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; Departamento de Imunologia, Departamento de Protozoologia, Departamento de Medicina Tropical, e Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract. Severe chronic damage to the heart and gastrointestinal tract in patients with Chagas' disease are often observed 10-20 years after the acute phase. The course of long-lasting infection with the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi* was studied in seven rhesus monkeys infected for 15-19 years. Subpatent parasitemia was detected in all studied animals, using hemoculture (two of seven), artificial xenodiagnosis (three of seven), and a polymerase chain reaction PCR (six of six). High titers of specific IgG antibody to *T. cruzi* persisted throughout the chronic phase of infection. Abnormal electrocardiographic (three of six) and echocardiographic (one of six) patterns detected in the *T. cruzi*-infected monkeys were possibly related to parasite-triggered myocardial damage. The results suggest that rhesus monkeys experimentally infected with *T. cruzi*, besides reproducing the acute phase of Chagas' disease, also develop chronic chagasic cardiomyopathy.

INTRODUCTION

Chagas' disease, which is caused by a flagellate protozoan parasite, *Trypanosoma cruzi*, and transmitted to humans by blood-sucking triatomine insects and by blood transfusions, is endemic in many regions of Latin America. The disease has a high social impact, enhancing morbidity and mortality, especially in patients with the chronic form of infection.¹ The pathogenesis of chronic chagasic cardiomyopathy is poorly understood due to the lack of a suitable animal model that fully reproduces the disease processes.

The rhesus monkey (*Macaca mulatta*) is closely related to human phylogenetically and physiologically. These monkeys have been used as experimental models for numerous human pathologies, including cardiovascular and infectious diseases.²⁻¹⁰

The acute phase of *T. cruzi* infection in rhesus monkeys is similar to that which occurs in humans.¹¹⁻¹³ Our previous studies described the acute and early chronic phases of infection in these monkeys over a three-year period of experimental infection with the Colombian strain of *T. cruzi*. Chagoma, patent parasitemia, circulating IgM and IgG antibodies specific for *T. cruzi*, and hematologic alterations (leukocytosis and lymphocytosis) were observed in the acute phase. Electrocardiographic alterations were minor and transient, similar to those observed in non-lethal human acute chagasic myocarditis up to the fifth month of infection. The heart muscle cells present various degrees of degenerative alterations and a striking increase in the number of lysosomal profiles that exhibit acid hydrolytic reaction products. A strong inflammatory reaction with lymphocytic infiltrate and eosinophils associated with ruptured cells was present.^{13,14}

Considering that approximately one-third of *T. cruzi*-infected humans develop severe chronic disease with irreversible damage to the heart and/or gastrointestinal tract with dilation and disorders of nerve conduction, it is crucial to understand the mechanisms leading to these organ-specific pathologies.¹⁵ Because these alterations are observed 10-20

years after the acute phase, we have examined long-lasting (15-19 years) *T. cruzi* experimental infection in seven male rhesus monkeys that were initially evaluating for the clinical, parasitologic, serologic, and hematologic aspects of the chronic infection.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Seven male *Macaca mulatta*, 22.7 ± 3.2 (mean \pm SD) years old and experimentally infected for 16.69 ± 1.48 (mean \pm SD) years, were maintained in non-human primate modular isolation units (Double L Group, Ltd., Monoma, IA) of the Department of Primatology at the Center for Laboratory Animal Breeding of the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil). Monkeys were caged individually, provided water *ad libitum*, and fed a standard commercial chow (Nuvilab Primates 6030; Nuvital, Colombo, Brazil) supplemented with fresh fruits, eggs, and vegetables. Temperature, humidity, and light/dark cycles were controlled to provide standard conditions. Two age-matched male monkeys were maintained uninfected as controls and were simultaneously analyzed.

Animal infection. Details of the infection methodology have been previously reported.¹³ Briefly, metacyclic trypomastigotes forms of the Colombian strain of *T. cruzi* were used to infect monkeys subcutaneously in the antero-lateral face of the arm.¹⁶ All manipulations were performed under anesthesia using ketamine chloride (Vetaset; Fort Dodge, Campinas, Brazil) (10 mg/kg of body weight) given intramuscularly and according to standard guidelines.¹⁷ All animals were analyzed 16.69 ± 1.48 (mean \pm SD) years after infection with *T. cruzi* and followed for 20 months. Body weight and temperature were measured regularly. Blood was obtained by puncture of the femoral vein and collection into appropriate tubes (Vacutainer®; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Standard techniques were used for hematologic evaluation (hemoglobin, hematocrit, red blood cell count, total and differential white cell count).

Direct parasitemia. Two blood smears from each monkey were stained with Giemsa and examined for patent parasitemia twice over an 11-month interval.

Hemoculture. Whole blood collected in EDTA (0.5 mL) was placed in 3 mL of NNN medium covered with 2 mL of liver infusion tryptose medium, mixed with 10% fetal calf serum and 140 mg/mL of gentamicin sulfate (Merck AS, Rio de Janeiro, Brazil), in quadruplicate.¹⁸⁻²⁰ The cultures were incubated at 28°C and analyzed twice a month for seven months. In negative results were obtained, the animals were analyzed two more times at intervals of seven months.²¹

Artificial xenodiagnosis. Thirty fourth and fifth instar nymphs of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* were fed with blood of rhesus monkeys that was collected in sodium heparin.²² The bugs were dissected and examined after 45 days for the presence of parasites. Those monkeys that yielded negative results were analyzed three more times at intervals of two months.

Extraction of DNA and polymerase chain reaction (PCR) conditions. Ten milliliters of blood were mixed with an equal volume of 6 M guanidine hydrochloride/200 mM EDTA buffer.²³ The mixture was immersed for 15 minutes in boiling water and DNA was purified using two aliquots (200 µL) of each sample after extraction with phenol-chloroform and precipitation with ethanol.²⁴ A 7.5-µL aliquot of DNA resuspended in water was PCR amplified using *T. cruzi*-specific minicircle primers (#121 5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3' and #122 5'-GGTTCGAT-TGGGGTTGGTGTAAATATA-3'). The reaction mixture contained 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 4.0 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0.4 µM of each oligonucleotide primer, and 2.5 units of *Taq* DNA polymerase in a final volume of 100 µL. The PCR was conducted in a Perkin-Elmer Cetus (Boston, MA) DNA Thermal cycler GeneAmp PCR System 9600, using two cycles at 98°C for one minute and 64°C for two minutes, 33 cycles at 94°C for one minute and 64°C for one minute, followed by one extension step at 72°C for 10 minutes. Samples that were negative after *T. cruzi*-specific amplification were checked for possible inhibition with human β-globin specific primers (#PCO3 5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3' and #PCO4 5'-CAACTCATCCACGTTACC-3'), using the same aforementioned protocol.²⁵ Samples showing DNA inhibition were retested after a new DNA extraction.

Serology. Specific IgG antibodies to *T. cruzi* were measured by indirect immunofluorescence (IIF) and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using commercial kits produced by Bio-Manguinhos (Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil). These were performed in accordance with manufacturers' instructions. Two analyses were performed at an interval of 11 months.

Radiology. To evaluate cardiac and gastrointestinal alterations, we performed radiologic examinations (Polymat Plus 30/50; Siemens, Rio de Janeiro, Brazil) by means of uncontrasted radiographs of the thorax (front view) and contrast radiographs of the esophagus-stomach transit area. The large intestine was also examined using barium sulfate perfusion. An approximate indication of heart size relative to chest size (the cardiothoracic index [CTI]) was obtained according to the procedure of Falasca and others.²⁶ Two analyses were performed at an interval of 16 months.

Electrocardiograph (ECG) and echocardiograph. The classic 12-lead human ECG system was used; tracings were made at 25 mm/second and at a voltage of 1 mV standardized to 1 cm (ECG-6; Ecafix, Sao Paulo, Brazil). Two-dimensional and M-mode echocardiography were performed on a regular basis, recorded on a videotape, and printed on multi-image camera (Ultrasound Scanner EUB-555, Hitachi Medical Corp., Tokyo, Japan). An anesthetized monkey was positioned in left lateral decubitus and a transducer (5 MHz) was applied directly to the shaved thorax. The ventricular function was assessed in the M mode by calculating the fraction of ejection, in accordance with the guidelines provided by the Committee on M-mode Standardization of the American Society of Echocardiography and in the bi-dimensional mode by analyzing semiquantitatively the global systolic function, according to the procedures of Sahn and others²⁷ and Amico and others.²⁸

Two age-matched, uninfected, male animals (monkeys 81 and 94) maintained under the same experimental conditions as *T. cruzi*-infected animals and four age-matched, healthy, male rhesus monkeys (animals L17, L21, M31, and N31), obtained from the Primatology Department, were used as controls for the ECG, echocardiographic, and radiology examinations. Two analyses were performed on the infected and control animals at an interval of 16 months.

RESULTS

The present study aimed to characterize clinical alterations developed in rhesus monkeys infected for 15-19 years with the Colombian strain of *T. cruzi*. Periodical physical and clinical examinations revealed no other clinical infections or illnesses. The results of this cross-sectional study are demonstrated in Tables 1, 2, and 3.

General clinical aspects. Physical examinations showed that all monkeys were normal, except for an enlarged abdomen caused by excess adipose tissue. One of the infected animals (monkey 68) had unspecific artrosis and was humanely killed. No significant body weight or hematologic changes were detected in monkeys inoculated with *T. cruzi* compared with uninfected controls.

Parasite detection. Direct examination of blood samples failed to detect the presence of circulating *T. cruzi* trypomastigote forms. However, the presence of the parasite was demonstrated in all studied animals, using hemoculture, artificial xenodiagnosis and PCR (Table 1). Hemoculture was positive in two (28.5%) of seven animals, after 6 ± 1.41 (mean ± SD)

TABLE 1
Detection of *Trypanosoma cruzi* using artificial xenodiagnosis, hemoculture, and a polymerase chain reaction (PCR) in blood samples of rhesus monkeys during chronic infection

Monkey no.	Artificial xenodiagnosis	Hemoculture	PCR	
			<i>T. cruzi</i>	β-globin
42	Negative	Negative	Positive	Positive
64	Positive	Negative	Positive	Positive
68	Negative	Positive	Undetermined	Negative
90	Negative	Negative	Positive	Positive
95	Positive	Negative	Positive	Positive
99	Negative	Negative	Positive	Positive
103	Positive	Positive	Positive	Positive

TABLE 2
Electrocardiographic patterns detected in *Trypanosoma cruzi*-infected rhesus monkeys during chronic infection*

Monkey no.	Chronic phase (years after infection)	
	First analysis	Second analysis
Infected		
42	T wave abnormal (18.92)	Normal (19.08)
64	T wave inversion (18.67)	Normal (19.83)
90	Ventricular extrasystoles, T wave inversion (15.83)	Atrial extrasystoles (17)
95	ILBBB, T wave inversion (15.83)	ILBBB, T wave inversion, abnormal ventricular conduction (17)
99	Normal (15.83)	Normal (17)
103	Normal (15.83)	Incomplete AV block, T wave inversion (17)
Noninfected		
81	T wave inversion	Normal
94	Normal	Normal
L17	Normal	Normal
L21	Normal	Normal
M31	Normal	Normal
N31	Normal	T wave inversion

* ILBBB = Incomplete left bundle branch block; AV = atrioventricular.

months of culture incubation. Artificial xenodiagnosis was positive in three (42.8%) of seven monkeys. Although *T. infestans* were also used for artificial xenodiagnosis, only *P. megistus* were infected (1.6%). Positive PCR amplification products with primers that annealed to *T. cruzi* kDNA were detected in six (100%) of six animals (Figure 1) that showed amplification of the β -globin gene. One animal (monkey 68) was negative by PCR analysis. The negative PCR result was probably due to the presence of inhibitors in the DNA sample of animal 68, as confirmed by the lack of amplification of the β -globin gene (Table 1). The PCR could not be repeated because this animal had been humanely killed.

Specific IgG antibodies to *T. cruzi*. Specific IgG antibodies to *T. cruzi* with titers ranging from 1:80 to 1:640 (IIF cut-off value \geq 1:80) were detected (Figure 2) in all *T. cruzi*-infected animals at the first analysis. These results were confirmed using an ELISA, which showed the presence of antibodies to *T. cruzi* 18.05 \pm 1.32 years after experimental infection. Interestingly, monkey 99, which was positive at the first analysis (ELISA positive, IIF titer = 1:80), was seronegative (ELISA negative, IIF: titer 1:40) at the second evaluation carried out 11 months later. This animal was found to be negative in three additional tests performed at two-week intervals.

Radiologic studies. No radiologic alterations were observed in *T. cruzi*-infected monkeys, either with regard to the CTI obtained from the chest radiograph or the diameter of the esophagus and colon revealed by contrast radiography of the gastrointestinal tract.

TABLE 3
Summary of test results obtained with *Trypanosoma cruzi*-infected rhesus monkeys during chronic infection*

Monkey no.	Years after infection	Positive parasitemia	Serology	ECG alterations	Echocardiograph alterations
42	19.08	PCR	Positive	No	No
64	19.83	PCR, XD	Positive	No	No
68	17	HC	NP	NP	NP
90	17	PCR	Positive	Yes	No
95	17	PCR, XD	Positive	Yes	Yes
99	17	PCR	Negative	No	No
103	17	PCR, XD, HC	Positive	Yes	No

* ECG = electrocardiographic; PCR = polymerase chain reaction; XD = artificial xenodiagnosis; HC = hemoculture; NP = not performed.

Electrocardiographic and echocardiographic studies. The ECG alterations found in rhesus monkeys chronically infected with *T. cruzi* are summarized in Table 2. Five (83.3%) of six infected animals showed T wave alterations. These alterations were also found in two (33.3%) of six sex- and age-matched controls. The T wave abnormalities seen in *T. cruzi*-infected rhesus monkeys 42 and 64 and in control monkeys 81 and N31 appeared similar to those produced by anesthesia. The electrocardiographic patterns of one infected monkey (monkey 99) were normal. Interestingly, three of six *T. cruzi*-infected animals showed significant electrocardiographic abnormalities. In one infected animal (monkey 90), multiform ventricular extrasystoles and T wave inversion were observed at the first examination, and atrial extrasystoles were observed at the second analysis. In the second animal (monkey 95), incomplete left bundle branch block (ILBBB) was seen at both examinations, with more accentuated T wave inver-

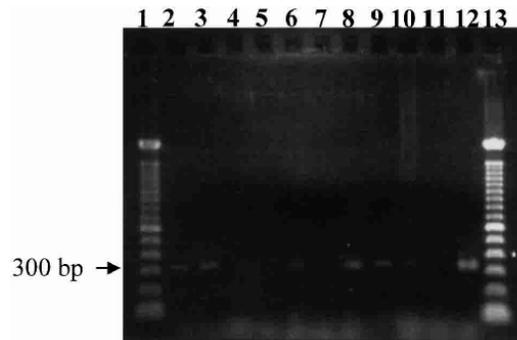


FIGURE 1. Representative results of polymerase chain reaction (PCR) amplification of variable regions of the *Trypanosoma cruzi* minicircle molecule from blood samples. The 330-basepair (bp) band is the expected *T. cruzi*-specific product. Molecular weight markers (100-bp ladder) are shown in lanes 1 and 13. Lanes 2, 3, 6, 8, 9, and 10 contain positive samples from infected monkeys (42, 64, 90, 95, 99, and 103, respectively). Lane 4 contains a negative sample from an infected monkey (68). Lanes 5 and 7 contain negative control samples from uninfected monkeys. Lane 11 contains a negative control in which no DNA was added to the PCR. Lane 12 contains a positive control from a confirmed chagasic human patient.

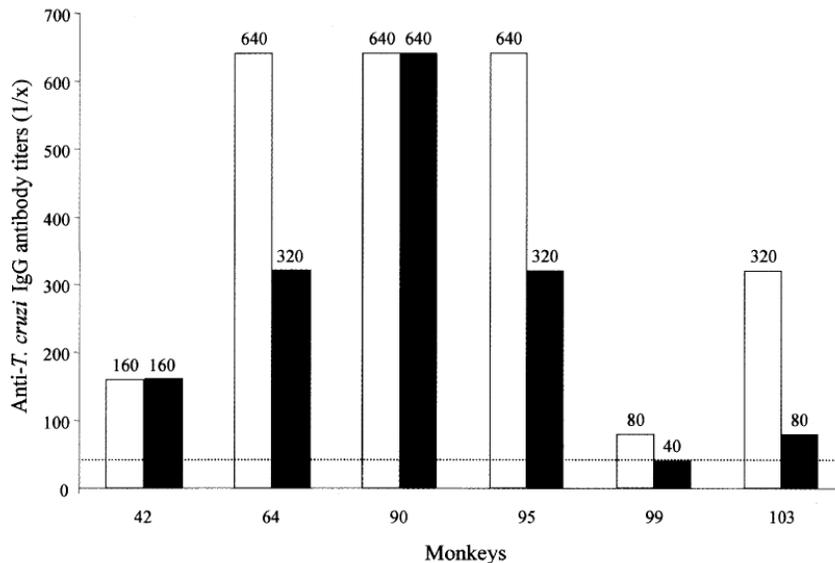


FIGURE 2. *Trypanosoma cruzi*-specific IgG titers from infected rhesus monkeys. Animals were analyzed 16.69 ± 1.48 (mean \pm SD) years after infection. Two indirect immunofluorescence evaluations were performed at an interval of 11 months. The white bars represent the first evaluation and the black bars represent the second evaluation. The dotted line represents the negative cut-off value. $1/x$ = reciprocal titer.

sion at the first examination (Figure 3). First-degree atrioventricular (AV) conduction disturbance and T wave inversion were observed in monkey 103 at the second examination. Only one of six infected monkeys (monkey 95) showed an echocardiographic abnormality, asynchronous interventricular septum motility (Figure 4), with a decrease in the ejection fraction.

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first report describing a well-characterized chronic phase of *T. cruzi* infection in a non-human primate. The main finding of our study was the presence of cardiomyopathy characterized by abnormal electrocardiographic and echocardiographic patterns in non-human primates compatible with ongoing Chagas' disease.

Due to the infrequency of clinical signs in the chronic phase, *T. cruzi* infection is difficult to identify without specific parasitologic and serologic tests.²⁹ Circulating *T. cruzi* was demonstrated by artificial xenodiagnosis in three infected monkeys and by hemoculture in two. Our findings are similar to those observed in humans and in other non-human primates during chronic Chagas' disease.³⁰⁻³³ Failure to isolate the parasite from seropositive monkeys was attributed to the scarcity of parasites in the bloodstream, as is commonly observed in the chronic human disease.³⁴

In the present study, only *P. megistus* bugs were infected by artificial xenodiagnosis, which corroborates a remarkable difference between vector species observed in previous studies.^{35,36} However, when *P. megistus*, *T. infestans*, and *Rhodnius prolixus* were used for xenodiagnosis of the Peru strain of *T. cruzi* in rhesus monkeys, only the two former species were suitable for the diagnosis of this particular strain.³⁷ Thus, our result may reflect interaction between the invertebrate host

and the Colombian strain in the chronic phase of the experimental infection when *T. cruzi* blood forms were scarce, since *T. infestans* were infected by xenodiagnosis during the acute phase.¹³

The performance of the PCR far exceeded that of artificial xenodiagnosis or hemoculture, and may become the gold standard technique for parasite detection in the chronic phase of Chagas' disease in rhesus monkey, as previously demonstrated for human patients, since the sensitivity of the amplification process is believed to be sufficient to detect a single parasite in 20 mL of peripheral blood.^{24,38,39} Our results suggest the persistence of the parasite, although scarce in circulating blood, during long-lasting infection of rhesus monkeys with the Colombian strain of *T. cruzi*.

Rhesus monkeys can live up to 40 years in captivity.⁴⁰ Our results show that these animals can support a long-lasting sub-clinical *T. cruzi* infection with scarce parasitemia. Cellular and humoral immune responses are crucial to control parasitemia and parasitism during acute and chronic *T. cruzi* infection.⁴¹ Our results show that circulating antibodies to *T. cruzi* persisted throughout the chronic phase of infection and were not related to the presence of circulating parasites. Furthermore, profiles of humoral immune responses in *T. cruzi*-infected monkeys during acute and chronic infection were demonstrated to be similar to those observed in humans and *Cebus* monkeys.^{13,42-44} The limitations of serologic testing in the diagnosis of chronic Chagas' disease have long been recognized as the result of variations of antibody levels related to oscillatory periods of parasitemia.⁴⁵⁻⁴⁹ We showed that in a *T. cruzi*-infected rhesus monkey (monkey 99), the results of serologic analysis for IgG antibodies to *T. cruzi* became negative at the second evaluation carried out 11 months after the first analysis, when circulating parasites were not detected. Conversely, monkey 90 showed high levels of IgG antibody to

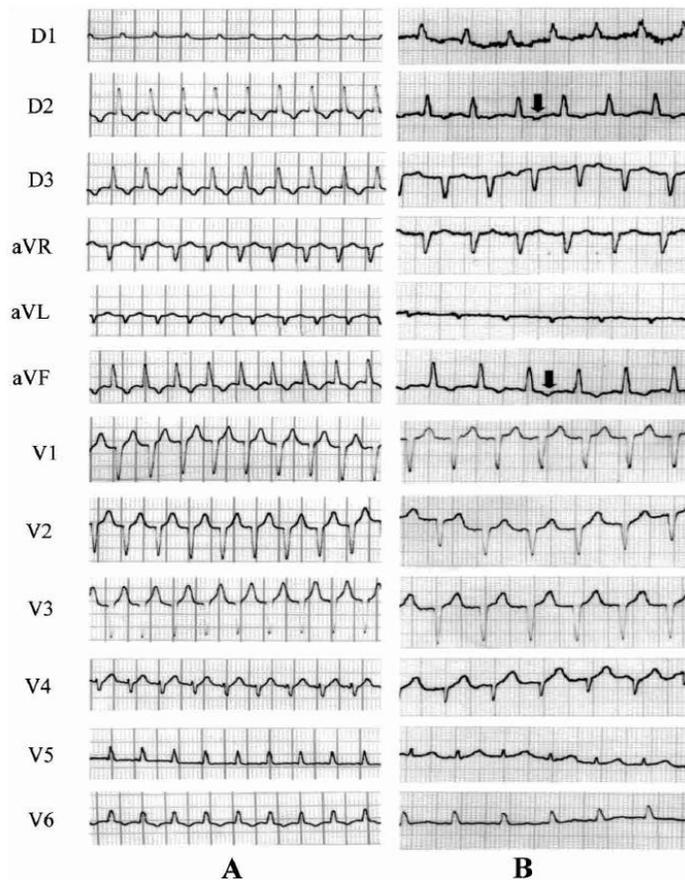


FIGURE 3. Electrocardiographic analysis of monkey 95 demonstrating incomplete left bundle branch block. A, First analysis. B, Second analysis. The arrows indicate T-wave inversion.

T. cruzi, but with negative parasitemia. However, both animals showed positive PCR results. Although these findings may be controversial, recent experimental data show that the detection of kinetoplast DNA (kDNA) by a PCR reflects the persistence of infection since *T. cruzi* kDNA was detected only for two days after injection into mice and not thereafter.⁵⁰ Furthermore, the detection of *T. cruzi* in monkey 99 by the PCR confirms the importance of this method for diagnosis, especially during the chronic phase.

The Colombian strain of *T. cruzi* has a peculiar capacity to reproduce several histopathologic aspects of the chronic chagasic cardiomyopathy in mice.^{16,51-53} Rhesus monkeys acutely infected with the Colombian strain also showed aggressive cardiomyopathy.^{13,14} In addition, the histopathologic analysis of the chronically infected monkeys that were killed (monkeys 42 and 68) confirms the presence of mild myocarditis in absence of significant ECG abnormalities (Carvalho CME and others, unpublished data). Interestingly, we have shown that rhesus monkeys chronically infected with the Colombian strain developed electrocardiographic alterations similar to those observed in chronic chagasic patients.⁵⁴⁻⁶⁴

Electrocardiographic abnormalities, suggesting the presence of acute *T. cruzi*-elicited myocarditis, have been described in *Cebus apella* and *Saimiri sciureus*.^{44,65-70} In fact, our animals presented several ECG abnormalities attributed to the presence of the parasite in the cardiac tissue from the fourth week of infection up to the 12th week of the acute phase.¹³ Moreover, after 17 years of infection, the ECG abnormalities in monkeys 90, 95, and 103 may have been due to *T. cruzi*-elicited myocardial damage, while the alterations observed in monkeys 42 and 64 were transitory and isolated, consequently without diagnostic significance, suggesting that these animals had the indeterminate form of chronic Chagas' disease.⁵⁵ This was further supported by the histopathologic finding of mild myocarditis in monkey 42 (Carvalho CME and others, unpublished data).

Other investigators have reported electrocardiographic alterations in non-human primates in the chronic phase of Chagas' disease, including rhesus and *Cebus* monkeys.^{26,42,66,67,71} Szarfman and others had observed ECG abnormalities suggestive of myocardial damage in a female rhesus monkey infected with *T. cruzi* 29 years earlier.⁴² Multifocal ventricular

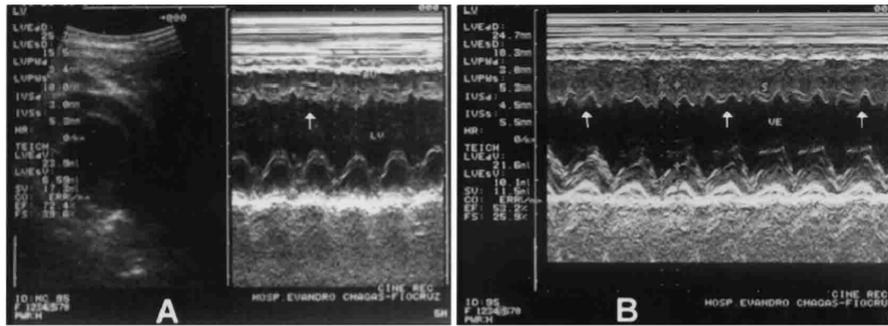


Figure 4. M-mode echocardiogram showing the change in interventricular septal motion (arrows) and a decrease in the ejection fraction (EF) in a *Trypanosoma cruzi*-infected rhesus monkey (95). **A**, first checkpoint demonstrating discrete echocardiographic abnormality in the septum motion. **B**, second checkpoint demonstrating aggravation in the change in interventricular septum motion and decrease in the EF.

extrasystoles and T wave inversion found in the monkey 90 have also been recorded in other animal models for chronic *T. cruzi*-induced heart disease, including rabbits, mice, and dogs.^{72–74} Importantly, these alterations are common in chronic Chagas' heart disease.^{56,57,63,75} The first-degree AV conduction disturbance and T wave abnormalities were also observed in one of the *T. cruzi*-infected monkeys (monkey 103). Furthermore, the first-degree AV block suggests damage to the atrioventricular node or to the autonomic nervous tissue supplying these regions that occurs mainly during the early stages of chronic Chagas' disease.^{62,76–78} Although first-degree AV block, T wave inversion, and extrasystoles may be considered unspecific alterations, our findings showing associations of these abnormalities may suggest a role for *T. cruzi* infection in the genesis of these dysfunctions, since these associations were absent in all control animals.⁷⁵

In monkey 95, ILBBB with T wave inversion was observed. Right bundle branch block is the most frequent conduction disturbance in chronic Chagas' heart disease, and has a high prevalence (38.8–55.7%). In contrast, LBBB has a low prevalence (0.5–9.6%); however, left branch alterations are expected to appear when the injuries are much more severe.^{54,55,58,61,62,64,75,78} If one takes these into account, our findings suggest that the monkey 95 is developing significant *T. cruzi*-elicited heart disease. Unfortunately, since this study was a cross-sectional rather than longitudinal, the timing of the last normal ECG is unknown in this animal.

Echocardiography is a noninvasive tool frequently used for clinical diagnosis in chronic Chagas' disease that makes possible a direct evaluation of the presence, type, and extension of the myocardial involvement.^{59,79–82} It represents a more sensitive methodology in assessing cardiac performance than an ECG or chest radiographs. The asynchronous movement of the interventricular septum, with a decrease in the ejection fraction and an increase in the systolic diameter, were observed in our study (monkey 95). This condition has also been observed in *T. cruzi*-infected dogs and *Cebus* monkeys.^{26,74} In humans, the most typical echocardiographic findings are apical left ventricular aneurysm and/or posterior basal akinesia or hypokinesia with preserved septal contraction. In cases of advanced cardiomyopathy with cardiac failure, biventricular dilatation occurs without hypertrophy.^{81,83} In our study, this asynchronous movement of the interventricular septum is at-

tributed to the ILBBB observed in the same animal. Importantly, Casado and others have suggested that during late-stage disease, when several significant ECG abnormalities are detected, there is an increase in the left ventricular volume and a decrease in the ejection fraction, as observed in the records of monkey 95.⁸⁴

Relative to humans, infected rhesus monkeys seem to develop the chronic phase of Chagas' heart disease, with a long asymptomatic evolution. Although the ECG and echocardiography abnormal patterns reported here are not frequently observed in human chronic Chagas' disease, they are highly relevant when detected. In fact, studies carried out in Brazil have demonstrated a low incidence of LBBB; however, this abnormality has been more frequently described in chagasic patients and individuals with cardiomyopathies of obscure origin from Colombia, the origin of the *T. cruzi* strain used here, and in mammalian reservoirs from Panama.^{16,58,61,85,86} In addition, the low morbidity of Chagas' disease in Colombia is postulated to be due to the genotype of the circulating parasites.^{56,87} Thus, one cannot exclude the possibility that the particular findings observed in our group of *T. cruzi*-infected rhesus monkeys are due mainly to the Colombian strain of the parasite used in our study.

In conclusion, the findings reported here support the validity of rhesus monkeys as an experimental model for acute, indeterminate, and cardiac chronic Chagas' disease. These findings will also contribute to a better understanding of the parasite/host interactions and the physiopathogenesis of this parasitic disease, and can be used to evaluate new *T. cruzi*-specific chemotherapy and identify putative markers for disease progression.

Received August 7, 2002. Accepted for publication February 5, 2003.

Acknowledgments: We are grateful to Maria Celeste Dias Spata for excellent technical assistance, and to Carlos José Carvalho Moreira for providing *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus*. We thank Cristiane V. Lisboa for helping with the hemoculture preparation and analysis, and Dr. Eleonora Carregal for excellent assistance in the radiologic analysis. We are also indebted to Dr. John L. VanDeBerg for critically reading the manuscript.

Financial support: This work was supported by grants from Fundação Oswaldo Cruz (Programa de Apoio à Pesquisa Estratégica em Saúde-2), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 131701/00-2). Cristiano Marcelo Espinola Carvalho,

Joseli Lannes-Vieira, and Maria da Glória Bonecini-Almeida are fellows of CNPq.

Authors' addresses: Cristiano Marcelo Espinola Carvalho and Maria da Glória Bonecini-Almeida, Laboratório de Imunologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21045-900, Telephone: 55-21-2598-4266, Fax: 55-21-2590-9988, E-mail: bonecini@ipecc.fiocruz.br. Márcia Cristina Ribeiro de Andrade, Departamento de Primatologia, Centro de Criação de Animais de Laboratório, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21045-900, Telephone: 55-21-2598-4388, Fax: 55-21-259-02434. Sérgio Salles Xavier, Departamento de Especialidades Médicas, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, Telephone: 55-21-2598-4266, Fax: 55-21-2590-9988. Regina Helena Riccioppo Mangia and Octavio Fernandes, Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21045-900, Telephone: 55-21-2598-4338, Fax: 55-21-2280-3740. Constança Britto, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21045-900, Telephone: 55-21-2598-4324, Fax: 55-21-2590-3545. Joseli Lannes-Vieira, Departamento de Imunologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21045-900, Telephone: 55-21-2598-4428, Fax: 55-21-2280-1589.

REFERENCES

- WHO, 1997. Interruption of transmission, Brazil. *World Health Organ Wkly Epidemiol Rec* 72: 1-5.
- Clarkson TB, 1988. Nonhuman primate models of atherosclerosis. *Lab Anim Sci* 48: 569-572.
- Weingand KW, 1989. Recent advances in molecular pathology: Atherosclerosis research in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Exp Mol Pathol* 50: 1-15.
- Cefalu WT, Wagner JD, 1997. Aging and atherosclerosis in human and nonhuman primates. *Age* 20: 15-28.
- Kastello MD, Spertzel RO, 1973. The rhesus monkey as a model for the study of infectious disease. *Am J Phys Anthropol* 38: 501-504.
- Barker LF, Maynard JE, Purcell RH, Hoofnagle JH, Berquist KR, London WT, 1975. Viral hepatitis, type B, in experimental animals. *Am J Med Sci* 270: 189-195.
- Roberts ED, Bohm RP Jr, Cogswell FB, Lanners HN, Lowrie RC Jr, Povinelli L, Piesman J, Philipp MT, 1995. Chronic Lyme disease in the rhesus monkey. *Lab Invest* 72: 146-160.
- Boche D, Gray F, Khatissian E, Hurtrel M, Montagnier L, Hurtrel B, 1997. *Arch Anat Cytol Pathol* 45: 75-85.
- Durbin AP, Elkins WR, Murphy BR, 2000. African green monkeys provide a useful nonhuman primate model for the study of human parainfluenza virus types-1, -2, and -3 infection. *Vaccine* 18: 2462-2469.
- Nehete PN, Chitta S, Hossain MM, Hill L, Bernacki BJ, Baze W, Arlinghaus RB, Sastry KJ, 2001. Protection against chronic infection and AIDS by an HIV envelope peptide-cocktail vaccine in a pathogenic SHIV-rhesus model. *Vaccine* 20: 813-825.
- Marsden PD, Voller A, Seah SKK, Hawkey C, Green D, 1970. Behavior of a Peru strain of *Trypanosoma cruzi* in rhesus monkeys. *Rev Soc Bras Med Trop* 4: 178-182.
- Seah SKK, Marsden PD, Voller A, Pettitt LE, 1974. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rhesus monkeys: the acute phase. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 68: 63-69.
- Bonecini-Almeida MG, Galvão-Castro B, Pessoa MHR, Pírmex C, Laranja FS, 1990. Experimental Chagas' disease in rhesus monkeys. I Clinical, parasitological, hematological and anatomic-pathological studies in the acute and indeterminate phase of the disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 163-171.
- Meirelles MNL, Bonecini-Almeida MG, Pessoa MHR, Galvão-Castro B, 1990. *Trypanosoma cruzi*: Experimental Chagas' disease in rhesus monkeys. II Ultrastructural and Cytochemical studies of peroxidase and acid phosphatase activities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 173-181.
- WHO, 1996. Chagas disease: progress towards elimination of transmission, Argentina. *World Health Organ Wkly Epidemiol Rec* 76: 12-15.
- Federici EE, Abelmann WH, Neva FA, 1964. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 13: 272-280.
- Guidelines on the Care of Laboratory Animals and Their Use for Scientific Purposes. II, Pain, Analgesia and Anaesthesia*, 1989. London: The Royal Society and Universities Federation for Animal Welfare.
- Novy FG, Macneal WJ, 1904. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J Infect Dis* 1: 1-30.
- Nicole CH, 1908. Culture du parasite du bouton d'orient. *Comp R Hebdomaire Sci Acad (Paris)* 146: 842-843.
- Camargo EP, 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 6: 93-100.
- Chiari E, Pinto Dias JC, Lana M, Chiari CA, 1989. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 22: 19-23.
- Nussenzeig B, Sonntag R, 1952. Xenodiagnóstico artificial. Novo processo. Primeiros resultados positivos. *Rev Paul Med* 40: 41-43.
- Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L, 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 48: 211-222.
- Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM, 1993. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 171-172.
- Saiki RK, Scharf S, Fallona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N, 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Falasca A, Grana D, Buccolo J, Gili M, Merlo A, Zoppi J, Mareso E, 1986. Susceptibility of *Cebus apella* monkey to different strains of *Trypanosoma cruzi* after single or repeated inoculations. *Bull Pan Am Health Organ* 20: 117-137.
- Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A, 1978. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 58: 1072-1083.
- Amico AF, Lichtenberg GS, Reisner AS, Stone CK, Schwartz RG, Meltzer RS, 1989. Superiority of visual versus computerized echocardiographic estimation of radionuclide left ventricular ejection fraction. *Am Heart J* 118: 1259-1265.
- Kasa TJ, Lathrop GD, Dupuy HJ, Bonney CH, Toft JD, 1977. An endemic focus of *Trypanosoma cruzi* infection in a subhuman primate research colony. *J Am Vet Med Assoc* 171: 850-854.
- Chiari E, Brener Z, 1966. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na fase crônica. *Rev Inst Med Trop Med Sao Paulo* 8: 134-138.
- Marsden PD, Mott KE, Prata AR, 1969. Prevalencia de parasitemia de *Trypanosoma cruzi* em 8 famílias de uma zona endêmica. *Gaz Med Bahia* 69: 65-69.
- Bronfen E, Alvarenga NJ, 1991. Xenodiagnosis and criteria to assess the level of parasitemia in chronic chagasic patients. *Rev Soc Bras Med Trop* 24: 37-42.
- Marsden PD, Seah SKK, Draper CC, Pettitt LE, Miles MA, Voller A, 1976. Experimental *Trypanosoma cruzi* infections in rhesus monkeys. II. The early chronic phase. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 70: 247-251.
- WHO, 1974. Immunology of Chagas' disease. *Bull World Health Organ* 50: 459-472.
- Perlowagora-Szumlewicz A, Moreira CJM, 1994. *In vivo* differentiation of *Trypanosoma cruzi*. 1. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 603-618.
- Perlowagora-Szumlewicz A, Muller CA, Moreira CJM, 1988.

- Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 3. On the interaction of vector species and parasite strain in the reaction of bugs to infection by *Trypanosoma cruzi*. *Rev Saude Publica* 22: 390-400.
37. Miles MA, Patterson JW, Marsden PD, Minter DM, 1975. A comparison of *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* in the xenodiagnosis of a chronic *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* infection in a rhesus monkey (*Macaca mullatta*). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 69: 377-382.
 38. Avila HA, Borges-Pereira J, Thiemann O, Paiva E, Degraive W, Morel CM, Simpson L, 1993. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol* 31: 2421-2426.
 39. Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM, 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 51: 771-777.
 40. Lane MA, 2000. Nonhuman primate models in biogerontology. *Exp Gerontol* 35: 533-541.
 41. Brener Z, Gazzinelli RT, 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol* 114: 103-110.
 42. Szarfman A, Laranja FS, De Souza W, Galvão-Quintão L, Gerecht D, Shmunis GA, 1978. Tissue reacting antibodies in a rhesus monkey with long-term *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 27: 832-834.
 43. Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO, 2001. Chagas' disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol* 17: 286-291.
 44. Samudio M, Montenegro-James S, Kasamatsu E, Cabral M, Schinini A, Arias AR, James MA, 1999. Local and systemic cytokine expression during experimental chronic *Trypanosoma cruzi* infection in a *Cebus* monkey model. *Parasite Immunol* 21: 451-460.
 45. Pless M, Juranek D, Kozarsky P, Steurer F, Tapia G, Bermudez H, 1992. The epidemiology of Chagas' disease in a hyperendemic area of Cochabamba, Bolivia: a clinical study including electrocardiography, seroreactivity to *Trypanosoma cruzi*, xenodiagnosis, and domiciliary triatomine distribution. *Am J Trop Med Hyg* 47: 539-546.
 46. Andrade ALS, Martelli CMT, Luquetti AO, Oliveira OS, Almeida e Silva S, Zicker F, 1992. Serologic screening for *Trypanosoma cruzi* among blood donors in Central Brazil. *Bull Pan Am Health Organ* 26: 157-163.
 47. Carvalho MR, Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Shikanai-Yasuda MA, Ferreira AW, Pereira JB, Sáez-Alquezar A, Dorliach-Llacer PE, Chamone DF, 1993. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion* 33: 830-834.
 48. Salles NA, Sabino EC, Cliquet MC, Eluf-Neto J, Mayer A, Almeida Neto C, Mendonça MC, Dorliach-Llacer P, Chamone DF, Sáez-Alquezar A, 1996. Risk of exposure to Chagas' disease among seroreactive Brazilian blood donors. *Transfusion* 36: 969-973.
 49. Arteaga-Fernandez E, Barreto ACP, Ianni BM, Mady C, Bellotti G, Pileggi F, 1988. Variação temporal dos títulos das reações sorológicas na fase crônica da doença de Chagas e sua possível correlação clínica. *Arq Bras Cardiol* 51: 143-146.
 50. Tarleton RL, Zhang L, 1999. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today* 15: 94-99.
 51. Kumar R, Kline IK, Abelman WH, 1969. Experimental *Trypanosoma cruzi* myocarditis. Relative effects upon the right and left ventricles. *Am J Pathol* 57: 31-48.
 52. dos Santos PVA, Roffê E, Santiago HC, Torres RA, Marino APMP, Paiva CN, Silva AA, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J, 2001. Prevalence of CD8+alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L^{low}LFA-1^{high}VLA-4^{high} activation phenotype and expression of IFN- γ -inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infection* 3: 971-984.
 53. Andrade SG, 1990. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic cardiomyopathy in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 17-27.
 54. Dias E, Laranja FS, Nobrega G, 1945. Doença de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 43: 495-581.
 55. Rosenbaum MB, Alvarez AJ, 1955. The electrocardiogram in chronic chagasic myocarditis. *Am Heart J* 50: 492-527.
 56. Sanchez G, Duarte CA, Araujo J, D'Alessandro A, 1971. Infection by *Trypanosoma cruzi* in man versus Chagas' disease in Tibu, north of Santander, Colombia. *Bol Oficina Sanit Panam* 70: 463-471.
 57. Mello de Oliveira JA, Meira Oliveira JS, Koberle F, 1972. Pathologic anatomy of the His-Tawara system and electrocardiographic abnormalities in chronic Chagas' heart disease. *Arq Bras Cardiol* 25: 17-25.
 58. Rofeld A, Fernandes MAOC, Camargo NB, Moraes AP, Nero E Jr, Tranchesi J, Decourt LV, 1978. Eletrocardiograma em indivíduos com reação de Guerreiro-Machado positiva. *Arq Bras Cardiol* 31: 191-194.
 59. Bestetti RB, Dalbo CMR, Freitas OC, Teno LAC, Castilho OT, Oliveira JSM, 1994. Noninvasive predictors of mortality for patients with Chagas' heart disease: a multivariate stepwise logistic regression study. *Cardiology* 84: 261-267.
 60. Rocha A, Lima Filho JL, Silva Z, Heredita RAG, Lopes ER, 1994. Histopatologia da porção trabecular do ramo direito do feixe de His em chagásicos crônicos com bloqueio de ramo direito. *Arq Bras Cardiol* 63: 97-100.
 61. Silva MAD, Costa JM, Barbosa JM, Cabral F, Fragata Filho AA, Correa EB, Borges Filho R, Sousa JEMR, 1994. Fase crônica da doença de Chagas. Aspectos clínicos e evolutivos. *Arq Bras Cardiol* 63: 281-285.
 62. Andrade ALSS, Zicker F, Rassi A, Rassi AG, Oliveira RM, Silva AS, Andrade SS, Martelli CMT, 1998. Early electrocardiographic abnormalities in *Trypanosoma cruzi*-seropositive children. *Am J Trop Med Hyg* 59: 530-534.
 63. Bar ME, Pozzer DL, Alvarez BM, Vallejos JA, Storino RA, 1998. Estudio transversal clínico y epidemiológico de la enfermedad de Chagas em uma área rural del nordeste argentino. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 199-206.
 64. Castro C, Prata A, Macedo V, 2001. Estudo clínico durante 13 anos de 190 chagásicos crônicos de Mambá, Goiás, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 309-318.
 65. Torres CM, Tavares BM, 1958. Miocardite no macaco *Cebus* após inoculações repetidas com *Schizotrypanum cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 56: 85-119.
 66. Bolomo N, Milei J, Cossio P, Segura EL, Laguens RP, Fernández L, Arana RM, 1980. Enfermedad de Chagas experimental en un primate sulamericano (*Cebus* sp.). *Medicina (B Aires)* 40: 667-672.
 67. Rosner IM, Schinini A, Rovira T, de Arias A, Velásquez G, Monzón MI, Maldonado M, Ferro EA, Gateano R, 1988. Acute Chagas' disease in non-human primates. 1. Chronology of clinical events, clinical chemistry, ECG, radiology, parasitemia and immunological parameters in *Cebus apella* monkey. *Trop Med Parasitol* 39: 51-55.
 68. Almeida EA, Navarro MR, Guariento ME, Carvalho SS, 1992. Infecção experimental de macacos *Cebus apella* sp pelo *Trypanosoma cruzi*. Avaliação clínica, eletrocardiográfica e anatomopatológica. *Rev Soc Bras Med Trop* 25: 7-12.
 69. Riarte R, Sinagra A, Lauricella M, Bolomo N, Moreno M, Cossio P, Arana R, Segura EL, 1995. Chronic experimental infection by *Trypanosoma cruzi* in *Cebus apella* monkeys. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 733-740.
 70. Pung OJ, Hulsebos LH, Kuhn RE, 1988. Experimental Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi*) in the Brazilian squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): hematology, cardiology, cellular and humoral immune responses. *Int J Parasitol* 18: 115-120.
 71. Miles MA, Marsden PD, Pettitt LE, Draper CC, Watson S, Seah SKK, Hutt MSR, Fowler JM, 1979. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rhesus monkeys. III. Electrocardiographic and histopathological findings. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 528-532.
 72. Teixeira AR, Figueiredo F, Rezende Filho J, Macedo V, 1983. Chagas' disease: a clinical, parasitological, immunological, and pathological study in rabbits. *Am J Trop Med Hyg* 32: 258-272.

73. Postan M, Bailey JJ, Dvorak JÁ, McDaniel JP, Pottala EW, 1987. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. III. Histopathological and electrocardiographical responses to chronic infection. *Am J Trop Med Hyg* 37: 541-549.
74. Barr SC, Holmes RA, Klei TR, 1992. Electrocardiographic and echocardiographic features of trypanosomiasis in dogs inoculated with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. *Am J Vet Res* 53: 521-527.
75. Laranja FS, Dias E, Nobrega GC, Miranda A, 1956. Chagas' disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation* 14: 1035-1060.
76. Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Maguire JH, 1981. Experimental Chagas' disease in dogs: a pathological and ECG study of the chronic indeterminate phase of the infection. *Arch Pathol Lab Med* 105: 450-464.
77. Laranja FS, Dias E, Nobrega G, 1948. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 46: 473-529.
78. Acquatella H, Cataliotti F, Gomez-Mancebo JR, Davalos V, Villalobos L, 1987. Long-term control of Chagas' disease in Venezuela: effects on serologic findings, electrocardiographic abnormalities, and clinical outcome. *Circulation* 76: 556-562.
79. Acquatella H, Schiller NB, Puigbo JJ, Giordano H, Suarez JA, Casal H, Arreaza N, Valecillos R, Hirschhaut E, 1980. M-mode and two-dimensional echocardiography in chronic Chagas' heart disease. *Circulation* 62: 787-799.
80. Combellas I, Puigbo JJ, Acquatella H, Tortoledo F, Gomez JR, 1985. Echocardiographic features of impaired left ventricular diastolic function in Chagas' heart disease. *Br Heart J* 52: 298-309.
81. World Health Organization, 1984. Cardiomyopathies. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 697: 7-64.
82. Borges-Pereira J, Xavier SS, Pirmez C, Coura JR, 1998. Doença de Chagas em Virgem da Lapa, Minas Gerais, Brasil. IV. Aspectos clínicos e epidemiológicos do aneurisma ventricular esquerdo. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 457-463.
83. Rassi A Jr, Rassi A, Little WC, 2000. Chagas' heart disease. *Clin Cardiol* 23: 883-889.
84. Casado J, Davila DF, Donis JH, Torres A, Payares A, Colmenares R, Gottberg CF, 1990. Electrocardiographic abnormalities and left ventricular systolic function in Chagas' heart disease. *Int J Cardiol* 27: 55-62.
85. Araujo J, Sanchez G, Gutierrez J, Perez F, 1970. Cardiomyopathies of obscure origin in Cali, Colombia. Clinical, etiologic, and laboratory aspects. *Am Heart J* 80: 162-170.
86. Blandon R, Leandro IM, Johnson CM, 1995. Evaluacion clinica, electrocardiografica y angiografica de los reservorios naturales de la enfermedad de Chagas em la Republica de Panama. *Rev Med Panama* 20: 108-115.
87. Gutierrez R, Vera A, Luna DP, Sandoval CM, Ângulo VM, Brito C, Fernandes O, 2001. Epidemiological aspects of Chagas disease in Santander (Colombia). *Annals of the XXVIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease and XVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2001. Caxambu, Minas Gerais, Brazil*, 167.