

Electrocardiograma normal y patológico en el mono *Cebus apella*. Un modelo experimental de cardiopatía chagásica crónica

MONICA GILI*, DANIEL R. GRANA**, EDUARDO A. MARESO***, ENRIQUE GARCILAZO****,
CARLOS A. FALASCA*****

Universidad del Salvador, Facultad de Medicina, Instituto Latinoamericano de Investigaciones Médicas Universidad del Salvador (ILAIMUS), Buenos Aires

* Profesor Auxiliar de Cardiología. ** Jefe de Bioterio. *** Jefe de Patología, Profesor Titular de Histología. **** Jefe de Cardiología, Hospital Militar Central. ***** Director

Trabajo recibido para su publicación: 11/86. Aceptado: 4/87

Dirección para separatas: Prof. Dr. Carlos A. Falasca, Director ILAIMUS, Tucumán 1845, (1050) Buenos Aires, Argentina

*El desarrollo de modelos animales experimentales crónicos es esencial para el conocimiento de la patogénesis e inmunopatología de la enfermedad de Chagas-Mazza, en sus aspectos cardíacos y gastrointestinales. En nuestras investigaciones se utilizaron monos *Cebus apella*, originarios del Chaco Paraguayo, reproducidos en cautiverio. Se seleccionaron 53 monos, de los cuales 35 machos formaron el grupo control y 18 (16 machos, 2 hembras), jóvenes y adultos, fueron inoculados con tres diferentes cepas de *Tripanosoma cruzi* (Tc) (CA1: n=10; Colombiana: n=4; Tulabuén: n=4) con un inóculo de 1×10^4 y 3×10^6 formas sanguíneas de Tc por vía subconjuntival (sc) o intraperitoneal (ip) en forma única o iterativa, respectivamente. Se registraron alteraciones ECG en el 83% del grupo infectado, entre los 11 y 42 meses postinoculación. Los monos inoculados, una sola vez por vía sc con cepa CA1, presentaron trastornos ECG en el 90%. Las cepas Tulabuén y Colombiana produjeron alteraciones en el 75% de los ECG. La incidencia de las alteraciones y el tiempo de aparición varió, aparentemente, en función de la vía, cepa, inóculo y frecuencia de las inoculaciones. El estudio anatomopatológico de 6 animales inoculados y sacrificados mostró en todos los casos focos*

*de infiltrados linfoplasmocitarios y lesiones de atrofia con fibrosis miocárdica, que se incrementaba en función del tiempo postinfección. Nuestras investigaciones nos permiten concluir que el primate *Cebus apella* es un modelo experimental crónico accesible y de bajo costo de mantenimiento, que reproduce las lesiones ECG e histopatológicas, cardíacas y gastrointestinales similares a las chagásicas crónicas de los humanos.*

La enfermedad de Chagas-Mazza o tripanosomiasis americana es una de las principales causas de muerte en muchos países de Latinoamérica, desde el sur de los Estados Unidos de América del Norte hasta la Argentina inclusive.¹

La enfermedad presenta tres fases: aguda, latente y crónica.^{2,3} Durante la primera, entre el 3% y 10% de los casos son fatales. La etapa latente tiene una duración de diez a veinte años y es muy escaso el conocimiento clínico patológico de la misma. En la etapa crónica pueden encontrarse diversos grados de hipertrofia y dilatación cardíaca. Los nidos de amastigotes, en las fibras miocárdicas, son hallados ocasionalmente en esta fase.

La patogénesis de la miocardiopatía chagásica permanece aún con grandes interrogantes. Distintos mecanismos, inmunológicos,^{4,5} hipoxémicos^{6,7} y neurogénicos,⁸ han sido propuestos, pero la mayor parte de los aspectos permanece desconocida.

Una de las mayores dificultades para dar respuesta a estos interrogantes ha sido la falta de un criterio apropiado para la obtención de un modelo experimental que desarrolle alteraciones electrocar-

Esta investigación recibió apoyo de la Universidad del Salvador, Buenos Aires, Argentina, y en parte del Programa Especial de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales de la Organización Mundial de la Salud.

diográficas e histopatológicas similares a la forma humana en su fase crónica.

El objetivo de este trabajo fue describir la evolución natural, en sus aspectos electrocardiográficos e histopatológicos, de la infección experimental con diferentes cepas de Tc en el *Cebus apella*, un primate del Nuevo Mundo originario del Chaco Paraguayo. Estos hallazgos prueban que este primate es un modelo apropiado para el estudio fisiopatológico e inmunopatológico de las lesiones producidas por el Tc. Aspectos clínicos, parasitológicos, patológicos^{9,10} e inmunológicos¹¹ han sido previamente informados.

Consideramos que un modelo experimental de la enfermedad crónica de Chagas debería cumplir los siguientes requisitos:

- a) Sobrevivir la fase aguda de la infección.
- b) Mantener una prolongada parasitemia, detectable por xenodiagnóstico o hemocultivo y/o presentar positividad a las pruebas serológicas convencionales usadas para el diagnóstico en el humano.
- c) Presentar un perfil inmunológico basal semejante y con reacciones cruzadas con el humano.
- d) Presentar reacciones autoinmunes celulares y/o humorales.
- e) Desarrollar las formas cardíaca y/o digestiva crónicas de la enfermedad con las típicas lesiones histopatológicas.
- f) Producir las lesiones histopatológicas en períodos que, extrapolados, según el modelo animal utilizado, sean similares al humano.
- g) Desarrollar la enfermedad, independientemente de la edad y del sexo.
- h) Ser nativo de un área endémica (lo que facilita su obtención para los trabajos de investigación en esos lugares).
- i) Ser de fácil disponibilidad, reproducirse en cautiverio y su mantenimiento de un costo razonable.

MATERIAL Y METODO

Se seleccionaron 53 monos *Cebus* de la colonia externa de reproducción y cría, que fueron mantenidos en la colonia interna durante toda la experiencia en jaulas individuales, con provisión de agua permanente mediante picos automáticos y condiciones adecuadas para la especie. El alimento provisto (Cargill, Buenos Aires, Argentina) fue un balanceado en forma de pellet expandido, con un tenor de 25% de proteínas (290 calorías/10°C).

Los primates seleccionados para la experiencia estaban libres de infección chagásica natural, según se determinó por serología y xenodiagnóstico, con electrocardiograma (ECG), parámetros hematológicos y enzimas séricas normales.

Fueron divididos en cuatro grupos, uno control y tres infectados. La edad, sexo, peso, cepa, vía, inóculo y número de inoculaciones realizadas se detallan en la Tabla 1.

Tres cepas diferentes de Tc, CA1, Colombiana y Tulahuén, fueron utilizadas en esta experiencia.

Todas las cepas han sido mantenidas en nuestro laboratorio, por pasajes sucesivos de ratón a ratón (Swiss).

La vía, inóculo y frecuencia fueron diferentes según el tipo de cepa utilizada.

Diez machos adultos fueron infectados experimentalmente, con formas metacíclicas de la cepa CA1, por vía conjuntival, según el siguiente esquema:

- 1) Infección única:
 - a) 3 animales con 4×10^4 parásitos;
 - b) 4 animales con 1×10^6 parásitos.
- 2) Dos infecciones con un año de intervalo:
 - 3 animales con 4×10^4 y 1×10^6 parásitos respectivamente.
- 3) Infección múltiple.

En los grupos que fueron infectados con las cepas Colombiana y Tulahuén se utilizó la vía intraperitoneal (ip) con el objeto de lograr una mejor absorción del parásito. Las reinfecciones se realizaron con una frecuencia que fue dada por el pico de parasitemia en el ratón, de las distintas cepas utilizadas. Tuvieron por objeto poner a los animales en condiciones similares a las que se encuentran los individuos que habitan las zonas endémicas, donde los gérmenes de reinfección natural son variables y el número de parásitos que penetran en la circulación es desconocido.

Cuatro machos juveniles fueron inoculados ip con 3×10^6 formas sanguíneas de parásito de la cepa Tulahuén en 10-11 oportunidades.

Cuatro monos juveniles (dos machos y dos hembras) fueron inoculados 18 veces ip, con 3×10^6 formas sanguíneas de la cepa Colombiana.

La parasitemia, serología convencional y modificaciones electrocardiográficas fueron evaluadas por medio de los siguientes métodos:

	Gota fresca
	Gota fresca
• Parasitemia	Test de Strout
	Xenodiagnóstico
• Serología	Hemaglutinación indirecta (HAI)
	Enzimo-inmunoensayo (ELISA) - IgG
• Hematología	Hematocrito, hemoglobina, leucocitos, eritrocitos, plaquetas

Tabla 1
Diseño experimental

Material y método	Cepa			
	CA1	Colombiana	Tulahuén	Control
Número de animales	10	4	4	35
Sexo	machos	2 machos - 2 hembras	machos	machos
Edad estimada de la primera inoculación (años)	6-10	1,2-3	4-4,5	5-9
Peso (g)	2.110-3.320	940-1.800	1.660-1.950	2.250-2.570
Fecha de la primera inoculación	06/80 a 07/81	09/82 a 12/82	11/82 a 12/82	—
Número de inoculaciones	1 a 2	17 a 18	10 a 11	—
Número de T cruzi por inoculación	4×10^4 y/o 1×10^6	3×10^6	3×10^6	—
Vía de inoculación	conjuntival	ip	ip	—

Tabla 2
Valores promedio de los parámetros electrocardiográficos en un grupo control de monos Cebus
(n = 35)

	Frecuencia	ÂQRS (grados)	QRS (seg)	P(D2) (seg)	P (mm)	PR(D2) (seg)	QT(D2) (seg)	De flex. int. (seg)	T(VI) (mm)
\bar{X}	270,51	18,13	0,039	0,04	1,46	0,07	0,16	0,0193	1,31
DS	23,34	45,72	0,002	0,00	0,27	0,01	0,007	0,0011	0,33
ES	3,74	8,08	0,001	0,00	0,04	0,002	0,001	0,0003	0,11

Frecuencia: frecuencia cardíaca; ÂQRS: duración del QRS; duración de la onda P; altura de P; duración del intervalo PR; duración del intervalo QT; duración de la deflexión intrínseca; altura de la onda T. En el margen izquierdo figuran los valores promedios de las variables ($\bar{X} \pm DE$ y ES).

Tabla 3
Alteraciones electrocardiográficas en la fase crónica en monos inoculados con diferentes cepas de T cruzi

Característica electrocardiográfica	Cepa de T cruzi									
	%	CA1			Colombiana			Tulahuén		
		(n=10)	A/T	t	(n=4)	A/T	t	(n=4)	A/T	t
BIRD	20	2/10	32-47	0	0/4	20	0	0/4	18	
BRD	40*	4/10	27-47	25	1/4	18	25	1/4	18	
SVI	10	1/10	47	0	0/4	20	0	0/4	18	
TR	20	2/10	47-48	25	1/4	20	50	2/4	18	
HIA	10*	1/10	27	25	1/4	13	0	0/4	11	
Ext. SV	10	1/10	27	0	0/4	20	0	0/4	18	
Total ECG patológicos	90	9/10	27-48	75	3/4	13-20	75	3/4	11-18	

%. porcentaje de animales con alteración. A: número de animales con alteración. T: número total de animales del grupo. t: tiempo transcurrido (meses) después de la primera inoculación. *: un animal tenía ambas patologías asociadas. BIRD: bloqueo completo de rama derecha; BRD: bloqueo de rama derecha; SVI: sobrecarga ventricular izquierda; TR: trastornos de la repolarización; HIA: hemibloqueo izquierdo anterior; Ext. SV: extrasístole supraventricular.

- Enzimas séricas CPK, LDH, alpha HBDH
GPT, GOT, GGT
- Proteínas plasmáticas
- Electrocardiograma (ECG)

Las frecuencias con las cuales se realizaron los mismos fue semanal, durante los primeros tres meses de la infección, y luego bimensual, los dos primeros años; siendo mensual en la actualidad, a cuatro y cinco años postinfección.

Los parámetros electrocardiográficos de normalidad para la especie se estudiaron en treinta y cinco primates *Cebus*, libres de infección chagásica natural o experimental.

El manejo de los animales fue realizado bajo control anestésico, utilizando para tal fin clorhidrato de ketamina (Ketalar, Parke Davis) a razón de 10 mg/kg. Fueron inmovilizados en una camilla adecuada, en decúbito dorsal, y luego de 5 minutos de reposo se realizaron ECG completos. Para tal fin se utilizó un aparato Fukuda FJC-7100, a velocidad de 25 y 50 mm/seg.

Los electrodos estaban conectados a agujas hipodérmicas, implantadas en el tejido celular subcutáneo con el objeto de evitar la impedancia dérmica. Los electrodos de los miembros se colocaron en la cara anterior de los superiores y en la cara interna de los inferiores.

El electrodo precordial se ubicó en los reparos habituales utilizados en el humano de V1 a V6, además de V1R y V3R, con el objeto de lograr una mejor evaluación de las cavidades derechas.

Se realizó un estudio anatómico, topográfico y descriptivo del corazón normal en cuatro primates.

Los animales sacrificados para estudios anatomopatológicos fueron elegidos al azar entre aquellos inoculados que presentaban alteraciones electrocardiográficas y una sobrevida postinfección entre 11 y 47 meses. Además, 4 animales del grupo control fueron sacrificados con la misma finalidad.

Todos los órganos y tejidos fueron examinados en forma macroscópica y luego fijados en formaldehído, Zamboni y glutaraldehído, para técnica con hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y microscopía electrónica.

RESULTADOS

En los parámetros examinados en el grupo control no fue observado ningún tipo de alteración durante los cinco años de evaluación, que continúa en la actualidad.



Fig. 1. Anatomía del corazón *in situ*. Vista de la cavidad cardiotorácica abierta por su cara anterior, luego de retirar el peto externo costal.

Parasitemia y serología

En los tres grupos de animales infectados con Tc la parasitemia fue positiva, evidenciada por la gota fresca, el Strout y/o el xenodiagnóstico, hasta las semanas 21, 52 y 80 en las cepas CA1, Colombiana y Tulahuén, respectivamente. La serología específica para anti-Tc, determinada por HAI y ELISA, fue positiva a partir de la cuarta semana postinfección. Los títulos máximos para HAI variaron entre 1/128 para las cepas Colombiana y CA1 y 1/256 para la cepa Tulahuén, siendo más bajos a partir de la semana 49.

Ninguno de los animales murió espontáneamente durante la fase aguda de la infección, que fue subclínica y sin alteraciones del ECG basal. Tres animales infectados, uno con cepa CA1, uno con Colombiana y uno con Tulahuén, murieron espontáneamente en la etapa crónica, a los 46, 48 y 52 meses postinfección, con parasitemia negativa.

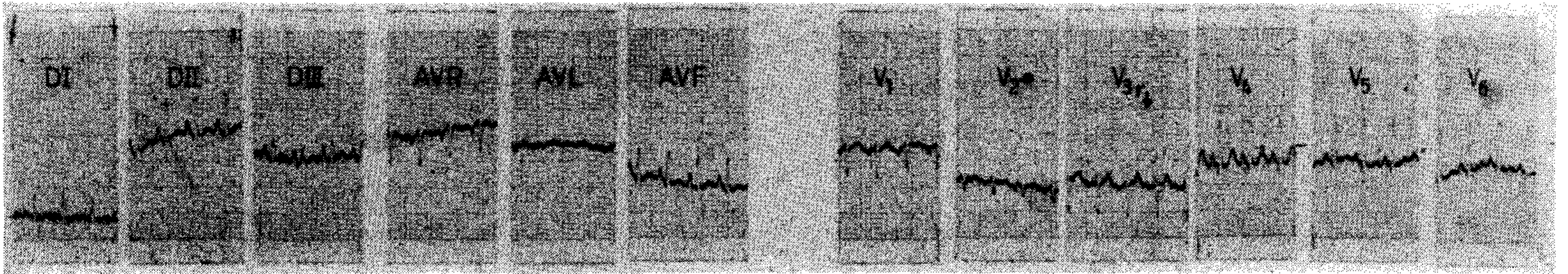


Fig. 2. Electrocardiograma normal de un mono Cebus del grupo control. Ritmo sinusal, eje eléctrico del QRS $+60^\circ$; onda P en D2, estrecha y picuda, frecuencia cardíaca 300 por minuto. Velocidad del papel, 25 mm/seg.



Fig. 3. Electrocardiogramas de tres monos Cebus infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*, en los cuales se observan las siguientes alteraciones: a) Hipertrofia de ventrículo derecho, con corazón punta atrás, y trastornos de conducción de la rama derecha. b) Hemibloqueo anterior izquierdo con importante hipertrofia biventricular. c) Bloqueo de rama derecha.

Anatomía macroscópica

Desde el punto de vista anatómico, el estudio macroscópico *in situ* del corazón del primate mostró una ubicación vertical en relación al eje longitudinal, comparable a la del corazón de un humano longilíneo.

Se observó una cara anterior con sus tres segmentos, ventricular, vascular y auricular, con las relaciones conservadas con la arteria pulmonar de ubicación anteroizquierda y una arteria aorta posteroderecha. Los dos tercios estaban ocupados por

ventrículo derecho y el tercio restante por ventrículo izquierdo, destacándose la presencia de la arteria coronaria descendente anterior, en el surco interventricular.

El segmento auricular ocupa la parte superior, estando la aurícula izquierda en ubicación postero-media con respecto a las otras cámaras.

La cara inferior está formada en un 80% por cámaras ventriculares, y la cara lateral convexa, en contacto con la concavidad pulmonar, formada por ventrículo izquierdo.

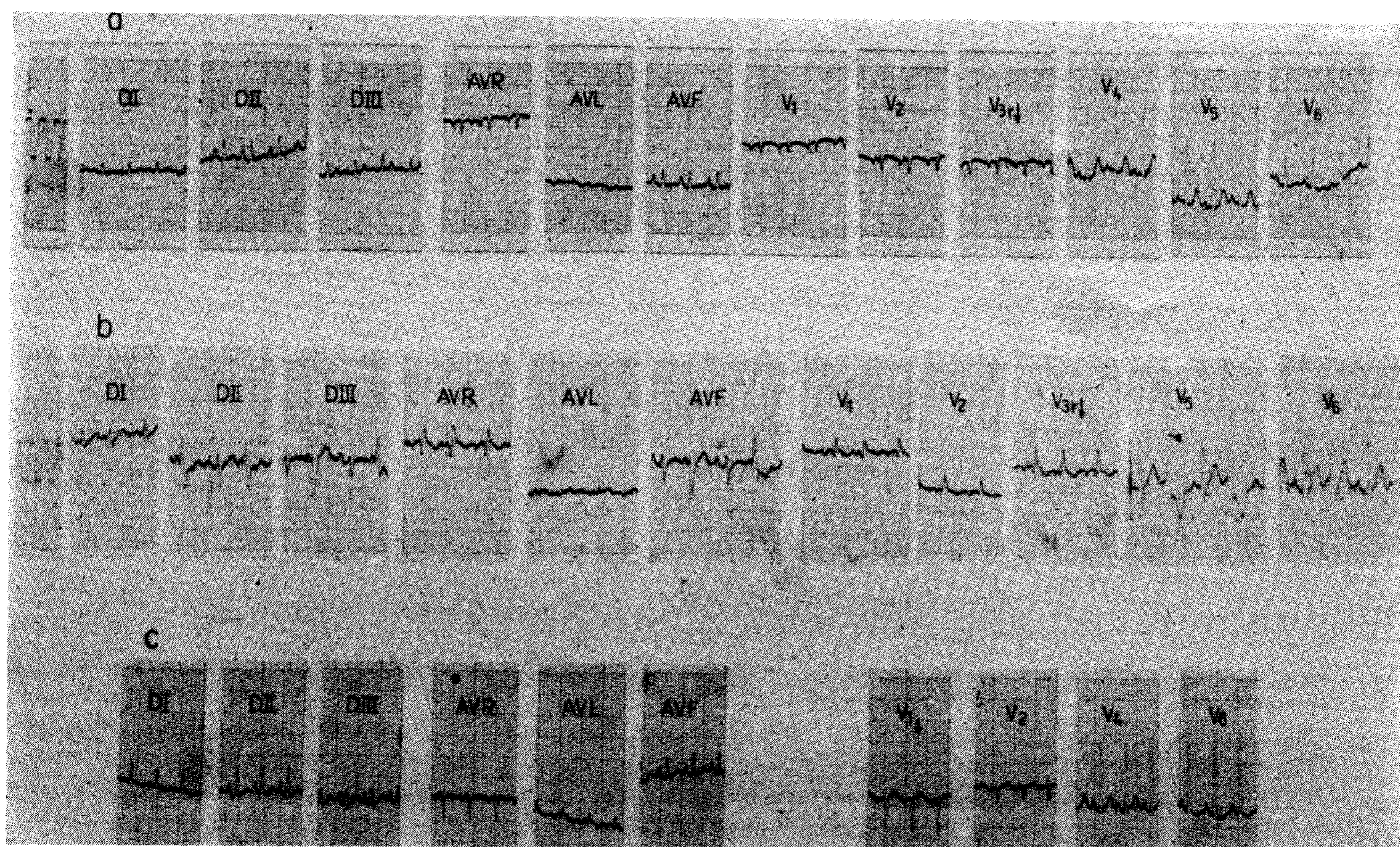


Fig. 4. Electrocardiogramas de tres monos *Cebus* infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*, en donde se observan las siguientes alteraciones: a) Desaparición de la progresión de R, de V1 a V3, compatible con fibrosis anteroseptal. b) Bloqueo de rama derecha y extrasistolia supraventricular aberrante polifocal. c) Hipertrofia ventricular izquierda con imagen de sobrecarga sistólica.

La base presentó una aurícula derecha con la entrada de las venas cava superior e inferior en su extremo lateral y de ubicación craneal y caudal respectivamente, debiéndose destacar una vena cava inferior de largo trayecto intratorácico (Fig. 1).

Electrocardiografía

Los resultados electrocardiográficos del grupo control están resumidos en la Tabla 2, en la cual están expresados los valores medios ($\bar{X} \pm ES$ y DS) para la frecuencia, el QRS en el eje frontal ($\hat{A}QRS$), duración de voltaje de la onda P, intervalo PR, intervalo QT, duración de la deflexión intrinsecoide, morfología y voltaje de la onda T.

Un ECG normal correspondiente a uno de estos monos está representado en la Figura 2.

La frecuencia cardíaca en reposo y bajo una leve anestesia varió entre 220 y 316 latidos por minuto, con una $\bar{X} \pm DS$ de $270,51 \pm 23,34$. La onda P fue angosta, con una corta duración de 0,04 seg y un voltaje relativamente alto de 1,46 mm, similar a la onda P picuda del humano. El intervalo PR fue corto y tuvo un valor promedio de 0,07 seg.

En 3/35 monos se observó una RSr' en V1 y

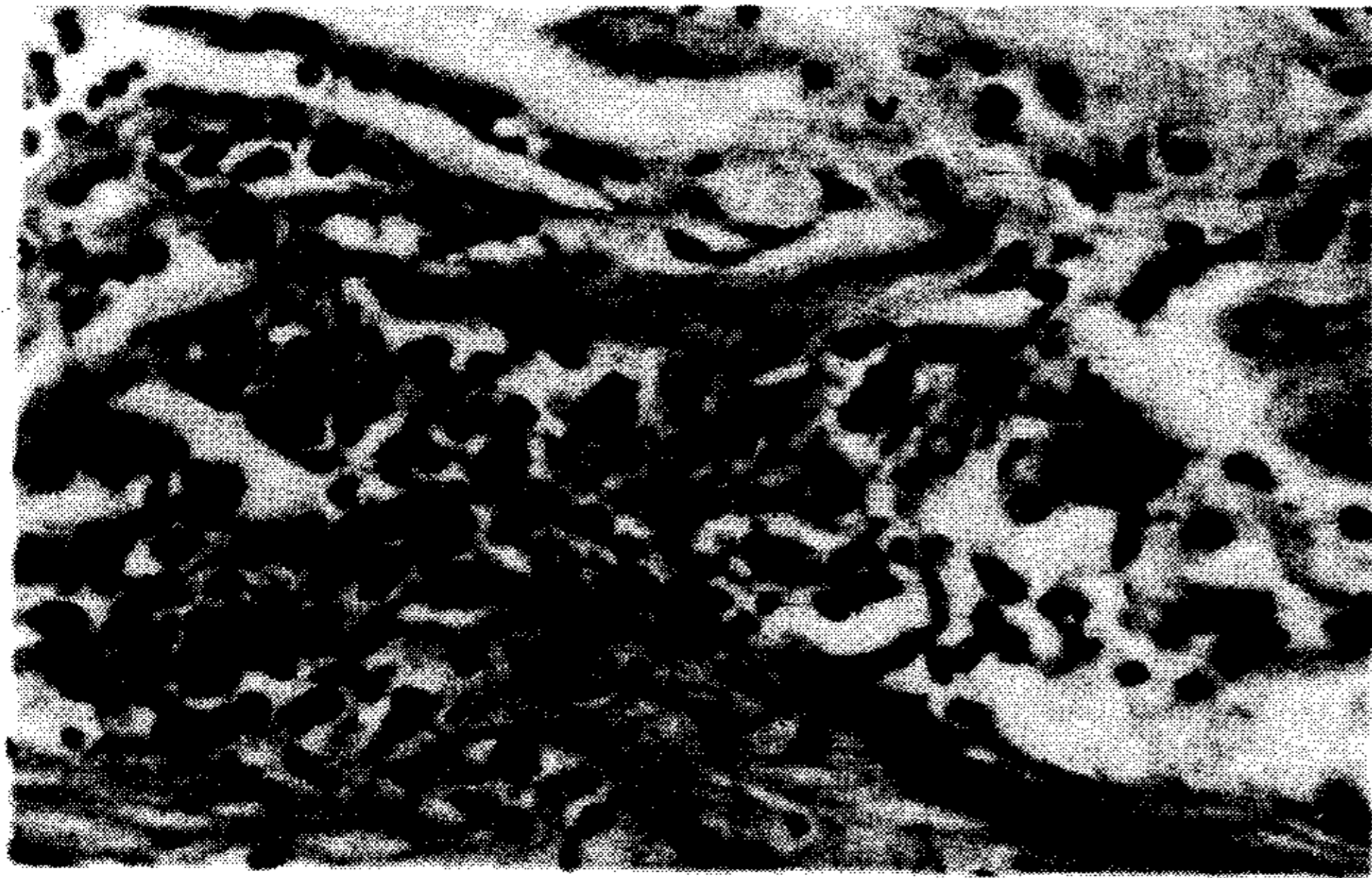
V2 que no se acompañó de otra alteración en el ECG. La presencia de Q en D2, D3 y aVF pequeña y angosta (0,5 mm y 0,02 seg) se observó en algunos animales sin morfología QS. Una Q septal en V3, V4 coincidió con la anatomía macroscópica donde la cara anterior del corazón estaba formada por ambos ventrículos. La presencia de S1-S2-S3 se interpretó como "punta atrás".

La duración promedio del QRS en el plano frontal (D2) fue de 0,039 seg.

La deflexión intrinsecoide fue de 0,0193 seg y el QT, medido en D2 en el plano frontal, de 0,16 seg.

El eje eléctrico medio era de $+18,13^\circ + 45,72^\circ$, con un rango de $+70^\circ$ a -60° . El 59% de los 35 monos presentaba un eje promedio de $+48,81^\circ$, con un rango de $+30^\circ$ a $+70^\circ$, mientras que el 11% tenía su eje en -60° , el 11% entre -30° y -45° , el 11% indeterminado, el 5% en 0° y el 3% a la derecha.

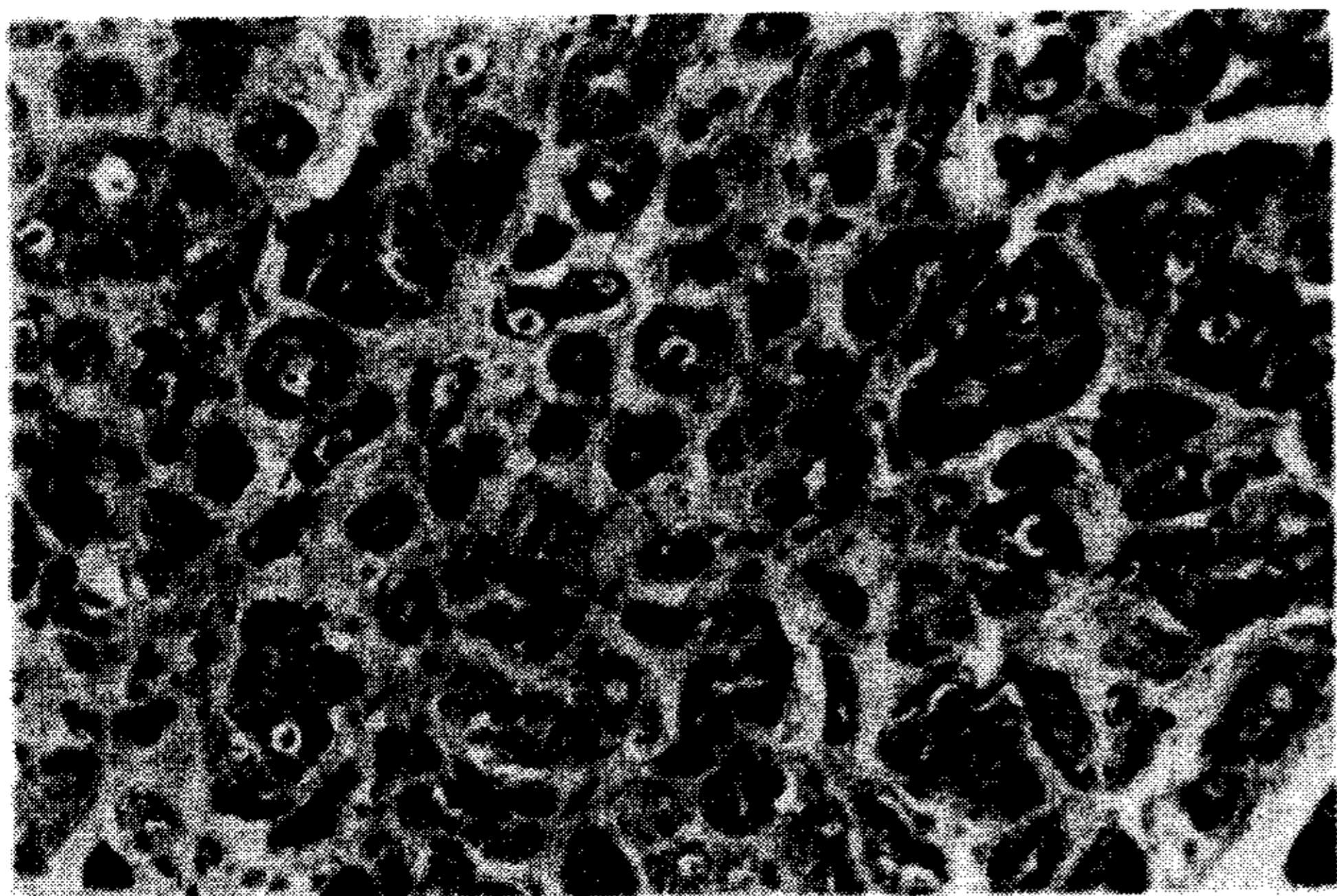
El segmento ST fue isoelectrico en todas las derivaciones y se observó rectificado en V6, en el 10% de los animales. La onda T fue positiva en el plano horizontal y frontal, con una media de 1,2 mm, medida en V1, excepto en aVR, que



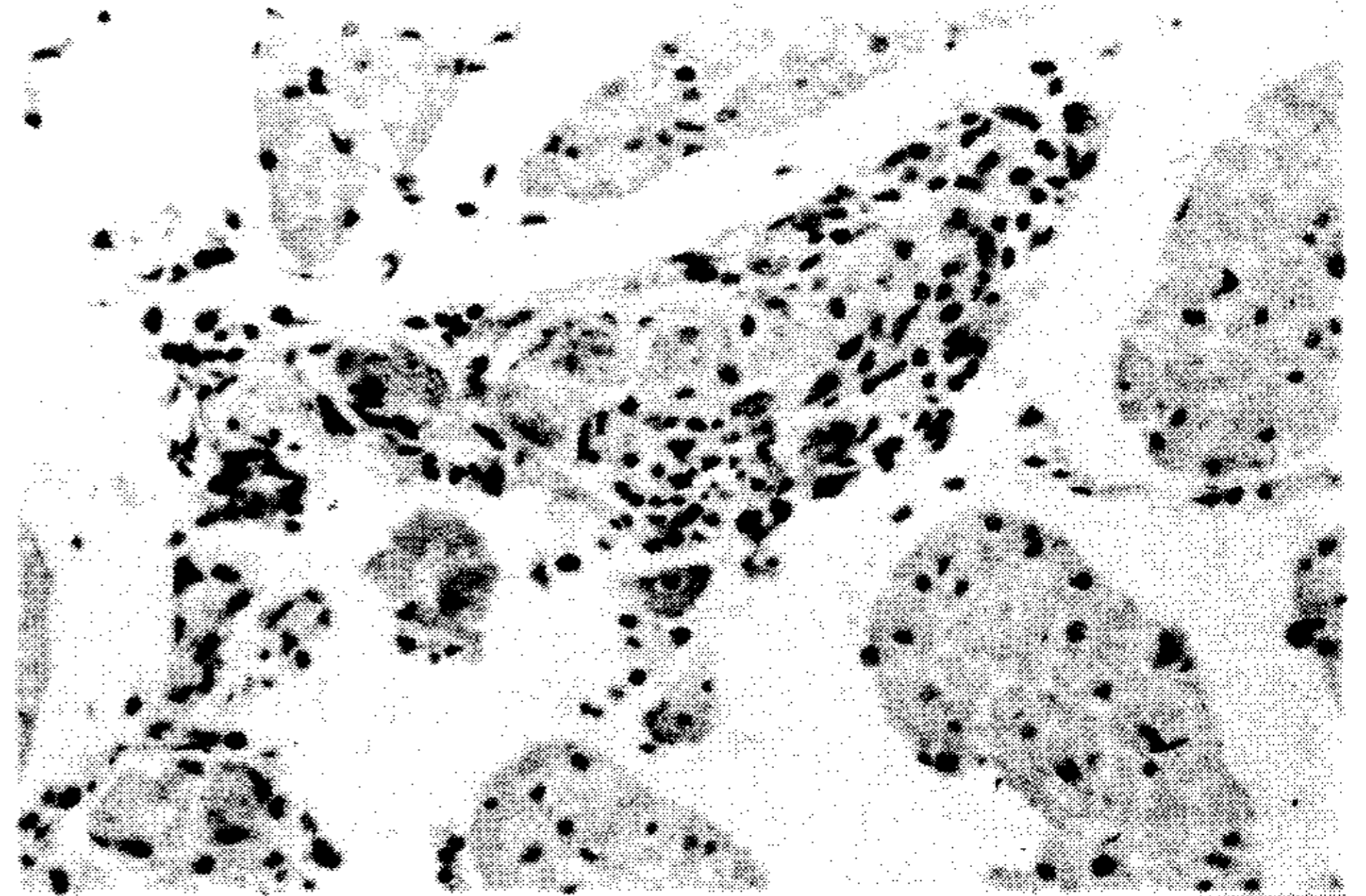
a



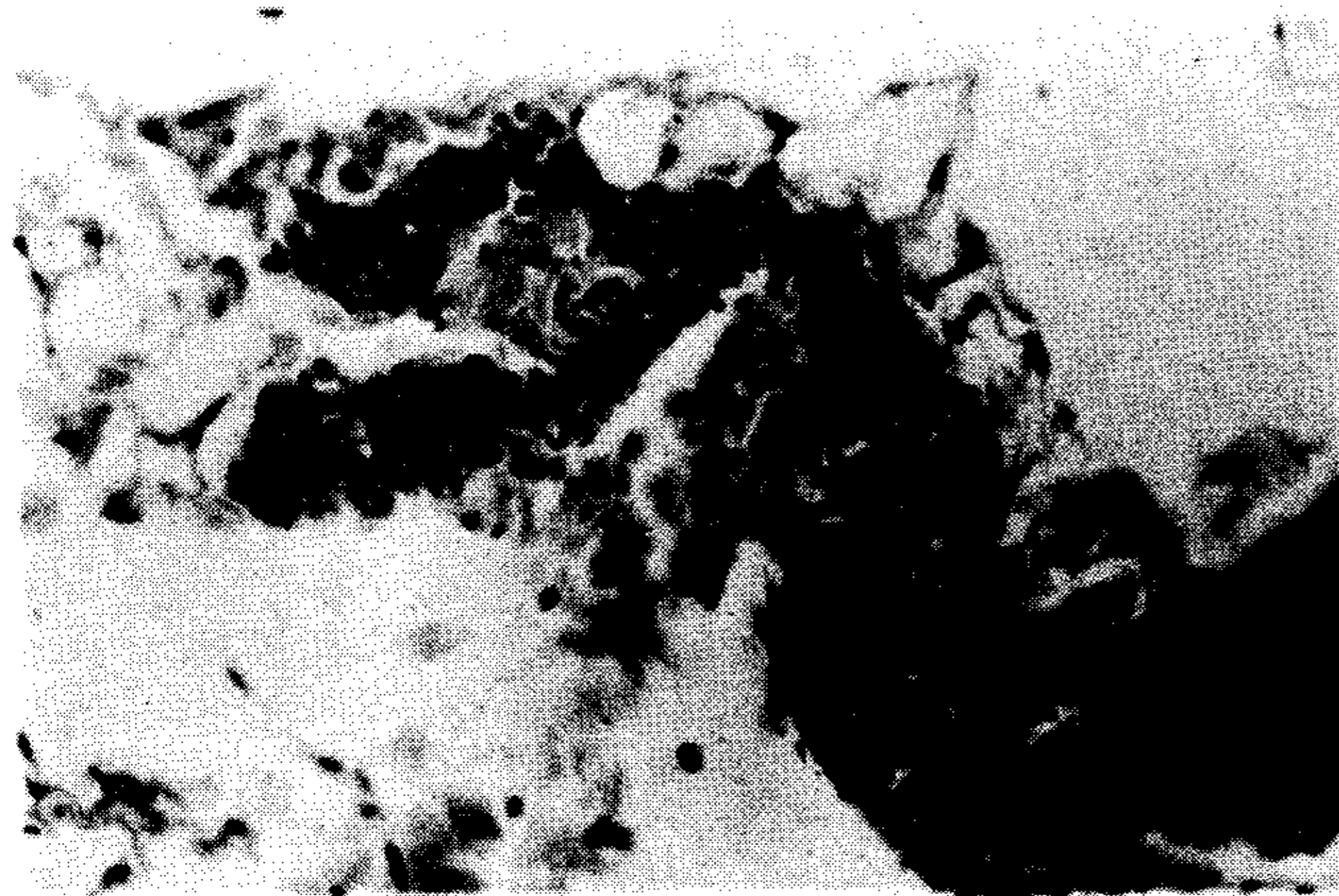
b



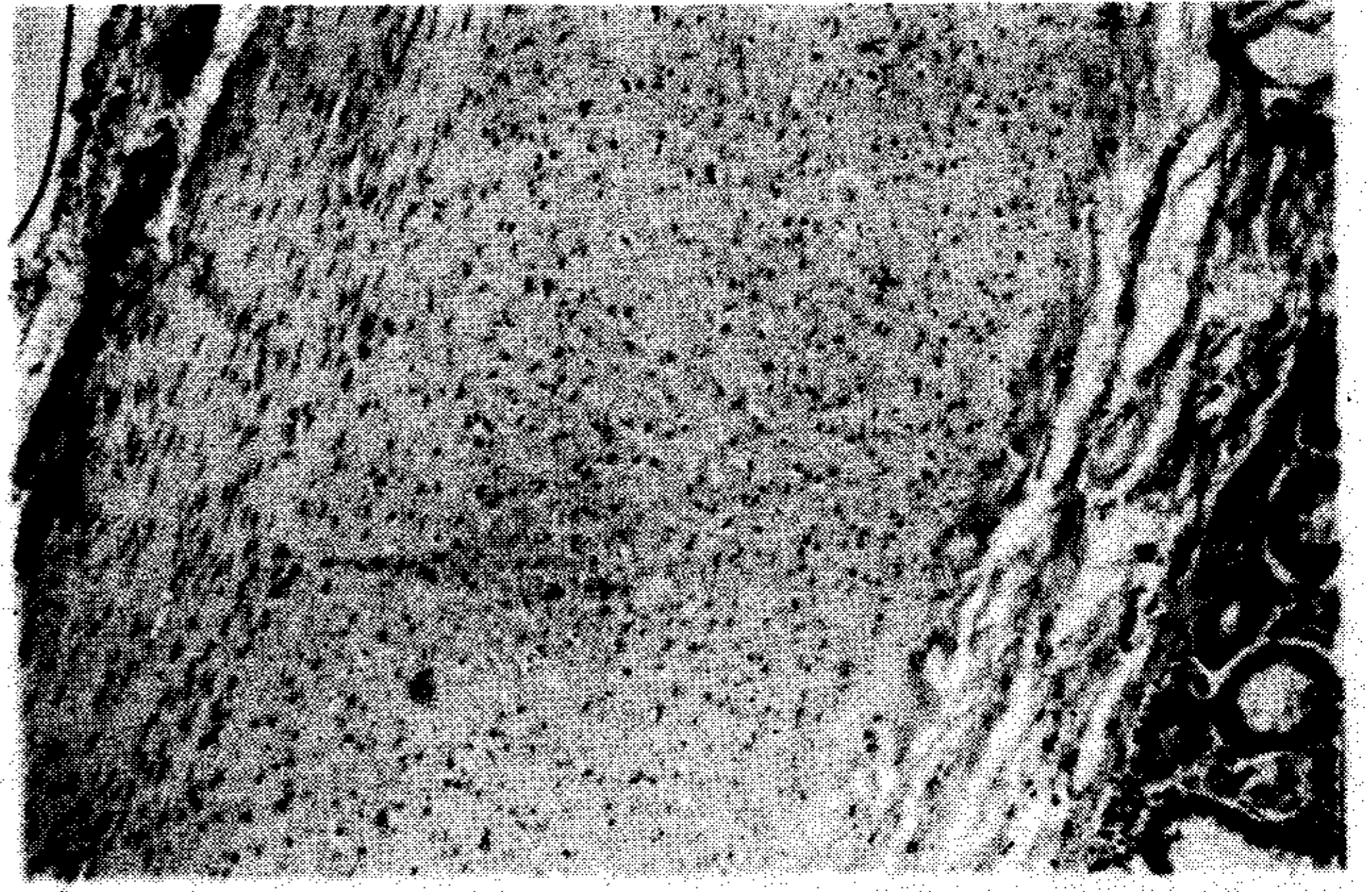
c



d



e



f

Fig. 5. Alteraciones miocárdicas y colónicas en monos *Cebus* inoculados con diferentes cepas de *T. cruzi*. a) Pared ventricular en la que se observa un área de infiltración celular con desorganización de la estructura fibrilar (H.E. 160x). b) Pared libre ventricular con área de fibrosis y atrofia fibrilar (tricroómico de Masson 40x). c) Septum interventricular con áreas fibrosas que desorganizan las fibras miocárdicas (tricroómico de Masson 100x). d) Tabique interauricular en el que se observan neuronas vegetativas rodeadas por infiltrados linfohistioplasmocitarios (H.E. 100x). e) Epicardio con gran acúmulo de elementos linfoplasmocitarios (H.E. 100x). f) Fragmento de pared rectal con marcada disminución de los elementos del plexo de Auerbach (H.E., 40x).

siempre fue negativa, y ocasionalmente en aVL.

No se observaron extrasístoles supraventriculares en ninguno de los monos estudiados.

En ningún caso se verificó depresión respiratoria o modificación del trazado por efecto de la anestesia.

En los animales infectados, se registraron alteraciones en el trazado del ECG en el 83,2%. La incidencia de las alteraciones halladas en cada uno de los grupos está resumida en la Tabla 3, en la cual está representado el porcentaje de las siguientes patologías: bloqueo incompleto de rama derecha (BIRD), bloqueo completo de rama derecha (BCRD), sobrecarga ventricular izquierda (SVI), trastornos de la repolarización (TR), hemibloqueo anterior izquierdo (HBAI) y extrasístole supraventricular (Ext SV).

La patología que se presentó entre los 11 y 18 meses en los grupos infectados con cepa Colombiana y Tulahuén respectivamente, y a los 36 meses en el grupo con cepa CA1, varió aparentemente, en función del inóculo, cepa y frecuencia de las inoculaciones, habiendo sido los trastornos de conducción de la rama derecha 60% (BIRD-BCRD), los que se presentaron con mayor frecuencia en el grupo inoculado con la cepa CA1. Extrasístoles supraventriculares se presentaron en un solo animal, concomitantemente con un BCRD.

En la cepa Colombiana, el BCRD, los TR y el HBAI se presentaron en el 75% de los monos infectados, mientras que los TR (50%) y el BCRD (25%) fueron las alteraciones observadas en los monos infectados con cepa Tulahuén (Fig. 3).

Las patentes electrocardiográficas en el grupo de animales infectados fueron semejantes a las que se describen habitualmente en la cardiopatía chagásica humana, en su etapa crónica.¹²⁻¹⁴

En la fase aguda, ninguno de los animales presentó trastornos en el trazado del ECG. Tampoco hubo muertes espontáneas durante la misma.

Del total de animales infectados, 3 murieron espontáneamente entre los 46, 48 y 52 meses postinoculación (1 cepa CA1; 1 cepa Tulahuén y 1 cepa Colombiana). Las alteraciones electrocardiográficas que presentaron en el último ECG fueron: TR, hipertrofia ventrículo izquierdo con agrandamiento auricular izquierdo y bradicardia sinusal con trastorno de conducción de la rama derecha, respectivamente.

Anatomía patológica

Ninguno de los animales del grupo control presentó lesiones cardíacas ni microscópicas.

En los seis monos sacrificados (tres de la cepa CA1, uno de la Tulahuén y dos de la Colombiana)

entre los 11 y 36 meses postinfección, todas las secciones, a nivel auricular, mostraron infiltrados subepicárdicos, especialmente importantes en la zona adyacente al nódulo sinusal.

En el septum interauricular, los infiltrados linfoplasmocitarios moderados podían ser observados entre las fibras musculares, algunas de las cuales mostraban signos de miocitolisis, y en la proximidad de las neuronas autónomas localizadas en la zona del nódulo auriculoventricular, donde eran particularmente evidentes, y circunscritos, reemplazando en algunos los elementos neuronales.

Esto fue observado en dos animales en los que las lesiones se presentaron tempranamente después de la primera inoculación.

Se observaron infiltrados subepicárdicos y subendoteliales en el área ventricular. Las paredes ventriculares mostraron focos de infiltrados con miocitolisis en células adyacentes, que disminuían francamente a medida que se incrementaba la presencia de fibrosis.

En la porción muscular del septum interventricular se observaron imágenes similares a las descritas anteriormente.

En todos los animales la sección del nódulo sinoauricular evidenció una arquitectura conservada, con algunos elementos linfoplasmocitarios entre las fibras de conducción, que eran más importantes en el tejido conectivo adyacente al nódulo, especialmente en la zona subpericárdica.

Las alteraciones observadas en el nódulo auriculoventricular y en el haz de His eran similares a las del nódulo sinusal.

En general, la intensidad de infiltrados linfoplasmocitarios y lesiones de atrofia con fibrosis miocárdica, estaban en relación inversa del tiempo postinfección. La fibrosis septal fue la lesión predominante en los animales con mayor tiempo de evolución.

En ninguno se observaron nidos de amastigotes en las fibras miocárdicas.

En tres de estos animales se encontró patología colónica con signos evidentes de disminución de las neuronas mientéricas en dos animales, e infiltrados linfoplasmocitarios perineuronales en uno de ellos que, concomitantemente, mostraba lesiones esofágicas con infiltración linfoplasmocitaria del plexo de Auerbach.

DISCUSION

La necesidad de un modelo experimental crónico de la enfermedad de Chagas, y particularmente de la cardiopatía chagásica que se presenta en el 90% de las autopsias,¹⁵ de pacientes fallecidos por esta

causa, es una realidad que se viene planteando hace varios años en el Programa de Enfermedades Tropicales de la Organización Mundial de la Salud, para poder avanzar en el conocimiento de la inmunopatogénesis en su etapa crónica.

Es generalmente aceptado que la infección experimental con Tc en un grupo diverso de especies animales puede conducir a índices de mortalidad que varían en función de factores inherentes al huésped (especie, edad, sexo, factores genéticos, estado nutricional, etc.) y al inóculo (dosis, vía, cepa, frecuencia de la infección).

Los monos *Cebus* infectados mostraron, durante el curso de la infección, independientemente de la cepa de Tc utilizada, conversión serológica con títulos positivos para anticuerpos específicos, detectados por HAI o por ELISA. Todos tuvieron parasitemia positiva detectada por gota fresca, Strout o xenodiagnóstico, durante la etapa aguda e indeterminada de la enfermedad. En la etapa crónica, como se observa en el humano, la parasitemia desapareció.

Es de considerable interés destacar que la supervivencia a la infección experimental durante la etapa aguda, en todos los monos inoculados, fue independiente del nivel y del tiempo de duración de la parasitemia. La virulencia del parásito es un importante determinante de la patogénesis de la enfermedad de Chagas que no se correlaciona necesariamente con los niveles de parasitemia alcanzados.

Los pacientes, generalmente, sobreviven a la fase aguda de la infección, durante la cual la parasitemia es en general alta, y mueren muchos años después, cuando la parasitemia no puede ser demostrada por los métodos convencionales.

Las alteraciones electrocardiográficas producidas por la infección experimental con Tc han sido estudiadas en ratones,¹⁶ ratas,¹⁷ perros,^{18,19} conejos²⁰ y primates.²¹⁻²³ Las alteraciones observadas fueron inespecíficas y de difícil interpretación, aun en los controles no infectados,²⁴ no pudiendo ser utilizadas como un elemento que demostrara fehacientemente la cardiopatía en su etapa crónica. Además, los estudios complementarios en algunos de estos modelos (ratón, rata) con métodos auxiliares de diagnóstico (ecocardiografía, centellografía) son casi imposibles por el tamaño anatómico del corazón, mientras que en el primate *Cebus* apella el primero de ellos ha sido utilizado por nosotros con muy buenos resultados,²⁵ al igual que la centellografía (datos sin publicar).

En general, el ECG del *Cebus* apella es similar al del humano y otros primates no humanos, pero existen algunas diferencias convenientes de destacar: primero, la alta frecuencia cardíaca, que puede

ser debida a su pequeño tamaño corporal y probablemente, también, a la descarga neurovegetativa producida por el atrape preexamen y la anestesia ($270 \pm 23,34$ minutos); segundo, una onda P angosta, de corta duración y un voltaje relativamente alto de 1,46 mm, similar a la P "picuda pulmonar", que también fue descrita en los primates del Viejo Mundo.^{26,27} Esta onda P, contrariamente a su significancia en patología humana, no está asociada a enfermedad pulmonar crónica; tercero, un intervalo PR corto y con un valor promedio de 0,07 segundos; cuarto, tampoco se observaron arritmias como se ven en un 2,3% en el mono Rhesus²⁸ y, contrariamente a éste,²⁹ los monos *Cebus* no presentaron bloqueos espontáneos de rama derecha.

Se debe recordar que el 22% de los monos tenía en el ECG un ÂQRS entre -30° y -60° y la "punta atrás" (S1-S2-S3), al analizar los cambios producidos en la conducción por la infección experimental, para evitar falsas interpretaciones.

Se debe destacar que ninguno de los animales del grupo control presentó depresión respiratoria o alteración del trazado electrocardiográfico durante la anestesia con ketamina.

Durante los cinco años de control continuado tampoco se evidenciaron alteraciones del ECG que impidieran compararlos con los animales infectados. Todos mantuvieron en ese lapso los mismos parámetros basales de normalidad que diferencian sustancialmente este animal de experimentación de otros modelos animales comúnmente utilizados.^{24,29}

El 83,2% de los animales presentaron alteraciones en los trazados electrocardiográficos, luego de la infección experimental, con diferentes cepas de Tc, independientemente de su edad y sexo. Las mismas se hicieron evidentes a partir de los 11 meses postinfección, habiendo variado en función de la cepa, vía e inóculo utilizados. Las cepas Colombiana y Tulahuén presentaron las alteraciones en forma más precoz que la cepa CA1.

La precocidad de presentación de las alteraciones del ECG favorece la utilización de este primate para el conocimiento de la evolución natural de la enfermedad, fundamentalmente en sus etapas indeterminada y crónica.

Las patentes electrocardiográficas más frecuentemente observadas (BCRD, HBAI, TR, SVI, bradicardia sinusal) son las que corresponden a aquellas descritas en la cardiopatía chagásica crónica humana.¹²⁻¹⁴ Además, son de fácil interpretación y reproducibilidad en el tiempo, y no se ven alteradas por efecto de la anestesia.

Estas alteraciones fueron correlacionadas con los hallazgos histopatológicos de los animales sacrifi-

cados, en los cuales las lesiones fueron de tipo miocárdico con miocitolisis. Los grados de infiltración linfoplasmocitaria y fibrosis tuvieron una relación inversa en función del tiempo post-infección. La fibrosis más importante se observó a nivel septal.

Durante la evolución natural de la infección (18 monos continúan bajo control) se produjeron tres muertes espontáneas, con patente electrocardiográfica de cardiopatía chagásica crónica, a los 46, 48 y 52 meses postinfección (cepas Tulahuén, Colombiana y CA1, respectivamente). La macroscopía de estos animales puso en evidencia, en todos ellos, agrandamiento de las cavidades derechas del corazón; en otro, concomitantemente, trombosis auricular y dos infartos hemorrágicos de pulmón por probable tromboembolismo. El que murió con un cuadro de insuficiencia cardíaca congestiva (ascitis, edema de extremidades inferiores e ingurgitación yugular) presentó también un megacolon con anillo estenótico en la unión rectosigmoidea).

Estos hallazgos indicarían que la variación del inóculo, la vía, la frecuencia de las inoculaciones, además de la virulencia de la cepa inoculada, podrían tener un importante papel en la evolución natural de la enfermedad, así como en su patogénesis e inmunopatología.

CONCLUSIONES

En consecuencia, el *Cebus apella*, un primate del Nuevo Mundo, originario de un área endémica, que se reproduce bien en cautiverio, adaptado a las condiciones de la colonia interna y que puede ser mantenido a un costo razonable, sería un modelo experimental apto para el estudio de la enfermedad de Chagas en su etapa crónica, ya que reproduce las alteraciones electrocardiográficas e histopatológicas humanas, en un breve tiempo postinfección experimental.

Su utilización, que está al alcance de todos los investigadores del área endémica, con el enfoque multidisciplinario y coordinado con que necesariamente debe ser tomado, nos permitirá avanzar en el conocimiento de la patogénesis e inmunopatología de la enfermedad, en sus etapas indeterminada y crónica. También permitirá la evaluación de nuevos inmunógenos y quimioterápicos que puedan actuar en estas etapas.

Esta patología, aún desconocida y de difícil tratamiento, continúa siendo, como ya lo considerara Chagas, uno de los más importantes y graves problemas médico-sociales en las áreas rurales de Latinoamérica. Sin embargo, en la actualidad es también un serio problema en las zonas urbanas,

ya que la patología aumenta en frecuencia, por las migraciones internas y por transmisión transfusional de dadores chagásicos no detectados. Esto nos obliga a unir y dirigir los recursos e investigaciones que se realizan, con una permanente auto-crítica y evaluación de los resultados.

SUMMARY

The development of experimental animal models, is essential for the knowledge of the pathogenesis and immunology of chronic Chagas' disease, in its cardiac and gastrointestinal aspects. In our research, Cebus apella monkeys, from the Paraguayan Chaco, bred in captivity, were used. Fifty three monkeys were selected and 35 of them (males) formed the control group and 18 (16 males and 2 females), juvenile and adult, were inoculated with 3 different Trypanosoma cruzi (Tc) strains (CA1, n=10; Colombian, n=4; Tulahuén, n=4) with an inoculum of 1×10^4 and 3×10^6 blood forms of Tc using the subconjunctival (sc) or intraperitoneal (ip) route, once or reiteratively, respectively. The studies were monthly performed with a FJC-7100 Fukuda equipment at 25 and 50 mm/sec. The animals were anesthetized with 10 mg/kg ketamine. The normal electrocardiogram (ECG) of the Cebus monkey is similar to that of other non-human primates but showed differences with that of man: a) high cardiac rate; b) presence of the "pulmonary" wave. The inoculated monkeys showed during the course of the infection, serologic conversion and the 63%, positive parasitemia. None of them died during the acute stage. The following ECG alterations were found in 63.2% of the infected group, between 11 and 47 months postinoculation. The monkeys inoculated once using the sc route with CA1, presented ECG alterations in the 90% and their frequency was: right bundle branch block (RBBB): 40%; intermitent right bundle branch block (IIRBB): 20%; left ventricle overload (LVO): 10%; repolarization disturbance: 20%; left anterior hemiblock (LAH): 10%; extrasystole: 10%. Those inoculated with Colombian strain (ip) showed ECG alterations in the 75%, corresponding to 25% to RBBB: 25%; RD: 25%; LAH: 25%. The Tulahuén strain produced alterations in the 75% of the ECG, a 25% of them was RBBB and the 50% RD. The incidence of the alterations and the time at which they appeared, seemed to vary in function of the route, strain, inoculum and frequency of the inoculations. The anatomopathological study of 6 animals inoculated and sacrificed showed in all the cases, foci of lymphoplasmocytic infiltrates and lesions of atrophy with myocardic

fibrosis that increased together with the time post-inoculation. Our studies permit us to conclude that the Cebus apella, a New World primate, native to an endemic area well reproducing in captivity, adapted to the indoor-colony conditions and that can be maintained at a reasonable cost would be an experimental model suitable for the study of chronic Chagas' disease, since it reproduces the human electrocardiographic and histopathological alterations, a short time after experimental infection.

BIBLIOGRAFIA

- World Health Organization Technical Report Series 697: Chagas' disease, cardiomyopathies. Report of a WHO Committee. World Health Organization, Geneva, 1984, pp 50-55.
- Prata A: Chagas' heart disease: introduction. *Cardiologia* 52: 79-81, 1968.
- Puigbó J: Chagas' heart disease: clinical aspects. *Cardiología* 52: 91-96, 1968.
- Cossio PM, Laguens RP, Diez C, Szarfman A, Segal A, Arana RM: Chagasic cardiopathy: antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation* 50: 1252-1259, 1974.
- Teixeira ARL, Teixeira L, Santos-Bush CA: The immunology of experimental Chagas' disease. IV. The production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. *Am J Pathol* 80: 163-177, 1975.
- Jorg ME: Tripanosomiasis cruzi; anarquía angiopatológica por descapilarización mesenquimorreactiva, cofactor patogénico de la miocardiopatía crónica. *Pren Méd Arg* 61: 94-106, 1974.
- Torres CM: Miocitólise e fibrose do miocárdio na doença de Chagas. *Mem Ints Oswaldo Cruz* 58: 161-182, 1960.
- Koberle F: Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. In: Dawes B (ed): *Advances in parasitology*, Vol 6, pp 63-116. Academic Press, London, 1968.
- Falasca CA, Gili M, Grana D, Mareso EA et al: Susceptibility of the Cebus apella monkey to different strains of T cruzi after single or repeated inoculations. *Bulletin Pan American Health Organization*. (Accepted February, 1986.)
- Falasca CA, Mareso EA: Un modelo experimental en un primate del nuevo mundo, para el estudio de la cardiopatía chagásica crónica. *Asociación Médica Argentina, Premio "Wellcome" de Investigación en Medicina Interna*, 1985.
- Eiguchi de Palmero K, Carbonetto Ch, Malchiodi EL, Margni RA, Falasca CA: Humoral and cellular immunological profile in Cebus apella monkeys, a model for chronic Chagas' disease. Cross reactivity with human immunoglobulins (en prensa). XII Reunión Anual sobre Pesquisa Básica en Enfermedad de Chagas. Caxambou, Brasil, 10-12 noviembre, 1986.
- Rosembaum MB, Alvarez A: The ECG in chronic chagasic myocarditis. *Am Heart* 4: 50, 1955.
- Rosembaum MB, Lazzari JO, Elizari MV: Los hemibloqueos. Paidós, Buenos Aires, 1970.
- Capris TA, Fernández Moores AJ: Alteraciones electrocardiográficas en la cardiopatía chagásica crónica. *Rev Arg Cardiol* 37: 200, 1967.
- Koberle F: Pathogenesis of Chagas disease. CIBA Foundation. Symp 20, 1974.
- Laguens RP, Meckert PC, Gelpi RJ: Chronic Chagas' disease in the mouse. I. Electrocardiographic and morphological patterns of the cardiopathy. *Medicina (Buenos Aires)* 41: 35-39, 1981.
- Revelli SS, Amerio N, Moreno HS, Valenti JL, Balbarrey H, Morini JC: Enfermedad de Chagas crónica en la rata. Características serológicas, electrocardiográficas e histopatológicas. *Medicina (Buenos Aires)* 40 (Suppl 1): 69-76.
- Anselmi A, Pifano F, Suárez A, Domínguez A, Vázquez A, Anselmi G: Experimental Schizotrypanum cruzi myocarditis. Correlation between histopathologic and electrocardiographic findings in experimental Chagas' heart disease. *American Heart Journal* 70: 683-685, 1965.
- Marsden P, Hagstrim JWC: Experimental Trypanosoma cruzi infection in beagle puppies. The effect of variations in the dose and source of infecting trypanosomes and the route of inoculations on the course of the infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 62: 816, 1968.
- Teixeira ARL, Figueiredo F, Rezende FJ, Macedo B: Chagas' disease: a clinical, parasitological, immunological and pathological study in rabbits. *Am Journ of Trop Med and Hyg* 32: 258-272, 1983.
- Dorland JD: Infection in monkeys with strains of Trypanosoma cruzi isolated in the United States. *US Pub Health Res* 58: 1006-1010, 1943.
- Torres CM, Tavares BM: Miocarditis no macaco Cebus apos inoculações repetidas con Schizotrypanum cruzi. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 56: 85-152, 1958.
- Marsden P, Seach SKK, Draper CC, Pettitt LE, Miles MA, Voller A: Experimental T cruzi infections in Rhesus monkeys. II. The early chronic phase. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 70: 247-251, 1976.
- De Oliveira JSM de, Bestetti RB, García Soares E, Marín Neto JA: Ajmaline-induced electrocardiographic changes in chronic Trypanosoma cruzi-infected rats. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 80: 415-419, 1986.
- Gili M, Grana D, Mareso E, Garcilazo E, Falasca CA: Ecocardiografía en modo M normal y patológica en el mono Cebus, un modelo experimental crónico de cardiopatía chagásica. VIII Jornadas Rioplatenses de Cardiología. Buenos Aires, diciembre 1986.
- Malinow MR, De Lannoy CW: The electrocardiogram of Macaca Fucata. *Folia Primatol* 7: 284, 1967.
- Malinow MR, De Lannoy CW: The electrocardiogram of cynopithecus niger. *Folia Primatol* 4: 66, 1966.
- Klein HO, Sullivan TA, Hoffman BF: Ectopic atrial rhythms in the primate. *Am Heart J* 87: 750, 1974.
- Bristow JD, Malinow MR: Spontaneous bundle branch block in rhesus monkeys. *Circulation Res* 16: 210, 1965.