

# **UN MODELO EXPERIMENTAL EN UN PRIMATE DEL NUEVO MUNDO, PARA EL ESTUDIO GASTROENTEROLOGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN SU ETAPA CRONICA\***

*Carlos Alberto Falasca, Alicia B. Merlo, Elena E. Gómez,  
Daniel R. Grana, Claudio Malatesta y Eduardo Mareso.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Debemos hacer una mención especial a las observaciones y sugerencias realizadas al trabajo por los distinguidos médicos brasileños, los Prof. Dr. Zilton Andrade y Joffre Resende.*

*Nuestro reconocimiento a los técnicos Principales del CONICET: Washington Sesma y Angel Di Martino por su labor iconográfica y a la técnica en Histología Sra. Claudia Chiesa.*

## **INTRODUCCION**

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una zoonosis que afecta al continente desde el paralelo 42 de latitud norte al paralelo 42 de latitud sur. Se estima que en nuestro país un 10% de la población (tres millones de personas) se hallan infectadas, y 16 personas morirían diariamente a consecuencia de la enfermedad (1).

\* El presente trabajo, realizado en el Instituto Latinoamericano de Investigaciones Médicas y Universidad del Salvador (ILAIMUS), fue distinguido en 1989 con el Premio Marcelo Roger, al mejor trabajo de Investigación, por la Sociedad Argentina de Gastroenterología.

La enfermedad es producida por el *T. cruzi* (protozoo flagelado del subgénero *Schizotrytanum*) cuyo ciclo de vida en el huésped vertebrado incluye triponastigotes en sangre y amastigotes intracelulares. Es transmitida por un insecto, el *Triatoma infestans* (vinchuca) o bien por transfusión sanguínea o en forma congénita.

La enfermedad está caracterizada por tres fases: aguda, indeterminada y crónica. La fase indeterminada duraría de 10 a 20 años, siendo poco conocidos los aspectos clínicos y patológicos de esta etapa (2), a diferencia de lo que ocurre en la etapa aguda, donde la enfermedad es producida por la presencia del parásito en las fibras musculares (3).

La etapa crónica de la enfermedad se caracteriza por cardiomiopatía crónica focal con fibrosis y lesiones asociadas al sistema de conducción. Raramente se observan parásitos en la fibra miocárdica (3).

En el tubo digestivo han sido descriptos infiltrados perineurales y disminución de neuronas en los plexos de Auerbach, los que son reemplazados por tejido fibroso. Estas lesiones determinan alteraciones de la secreción, motilidad y dilataciones viscerales, especialmente en esófago y colon, variando su incidencia entre el 16 y 50% en los distintos países (4).

Puede decirse que hay en la fase crónica una lesión generalizada del sistema nervioso autónomo, con o sin manifestaciones clínicas. La parasitemia es generalmente negativa y la serología positiva, pudiendo ocasionalmente, encontrarse nidos de amastigotes (5).

El estudio de la patogenia de las fases indeterminadas y crónicas es muy difícil debido a la lenta evolución de los mecanismos que actúan durante la enfermedad de Chagas, siendo por ello sumamente importante contar con un modelo animal apropiado para su estudio.

La diversificación de los objetivos estudiados y los modelos animales utilizados por los distintos grupos de investigadores hacen difícil desarrollar y reproducir, en los distintos laboratorios, las alteraciones cardiológicas, gastroenterológicas e histopatológicas de esta enfermedad en los diferentes modelos: rata (6), ratón (7), perro (8) y conejo (9).

El primate del Nuevo Mundo, *Cebus apella*, nativo del Chaco Argentino-Paraguayo, que desarrolla la enfermedad por infección natural (10), es en todos los aspectos estudiados hasta el presente un modelo útil para avanzar en el conocimiento fisiopatológico de la enfermedad de Chagas crónica (11, 12, 13, 14, 15, 16).

El objetivo del presente trabajo fue: a) estudiar la secreción ácida gástrica, basal y estimulada, ya sea por histamina o pentagastrina, teniendo en consideración que los pacientes con Chagas crónico presentan una hiposecreción ácida gástrica, con respecto a los individuos sanos, y b) describir los hallaz-

gos morfológicos observados, particularmente en el área gastroenterológica, en los primates experimentalmente infectados con diferentes cepas de *T. cruzi* y que murieron espontáneamente o fueron sacrificados. Ambos objetivos se cumplieron durante los primeros cinco años de evolución de la experiencia.

## MATERIAL Y METODO

Con el objeto de validar el modelo, fueron seleccionados de la colonia externa de reproducción y cría, 53 monos *Cebus*, con parámetros electrocardiográficos, ecocardiográficos (17) y hematológicos (18) y serología específica para Chagas negativa.

El diseño experimental se muestra en la Tabla 1. Se inocularon 18 primates, de ambos sexos, con diferentes cepas de *T. cruzi*: CA1 ( $n = 10$ , vía conjuntival, una dosis única de  $1 \times 10^4$  parásitos) y Tulahuen (T) y Colombiana (C) (ambos con  $n = 4$ , vía intraperitoneal (i.p.) y varias inoculaciones de  $3 \times 10^6$  parásitos). Las reiteradas inoculaciones pretendieron colocar a los animales en condiciones similares a la de los humanos de las zonas endémicas, en donde están expuestos a reinfecciones permanentes, y en los cuales, el número de parásitos que penetra en la circulación es desconocido.

En los animales del grupo control ( $n = 35$ ) e infectados ( $n = 18$ ), el seguimiento se realizó a través del estudio de la parasitemia (gota fresca, test de Strout (19), xenodiagnóstico (20)), serología convencional (hemaglutinación indirecta-Cellognost Chagas, Boehringer- e IgG por ELISA (21)), electro, ecocardiograma, centellografía con Tc 99 y radiología contrastada de colon y esófago. Los estudios electrocardiográficos y ecocardiográficos se realizaron una vez a la semana durante los primeros 3 meses post-infección, después 2 veces al mes durante los primeros 2 años post-infección y luego mensualmente hasta la actualidad en los animales sobrevivientes.

## Estudios Radiológicos

Con el objeto de evaluar específicamente las alteraciones producidas por la infección del tripanosoma en el área gastrointestinal, realizamos exámenes radiológicos en el grupo control e infectado, preinoculación, al año y a los tres años post-infección, por medio de: 1) radiografía de tórax frente, y 2) radiografía contrastada de esófago y colon.

El estudio contrastado del trácto gastrointestinal se realizó mediante la utilización de un equipo CGR, 1000 mAmp con scriógrafo e intensificador de imágenes, en circuito cerrado de televisión. No fueron utilizadas drogas

relajantes y la presión de perfusión de la sustancia de contraste fue permanentemente controlada para evitar imágenes con falsos positivos.

### Estudio de la secreción ácida gástrica

El patrón de secreción ácida gástrica se estudió en 24 monos Cebus (controles:  $n = 6$  e infectados:  $n = 18$ ), alojados en nuestra colonia interna, en jaulas individuales, con provisión libre de agua y alimento, en base a una dieta standard (25% de proteínas, 290 calorías/100 g) preparada por Cargill (Buenos Aires, Argentina) y suplementada con fruta fresca.

Después de una noche de ayuno, se los inmovilizó en un cepo y se los colocó un tubo nasogástrico radiopaco (Levin No. 10), ubicado fluoroscópicamente. Dos horas después se comenzó la prueba de secreción gástrica, con los animales alerta y sin sedación.

Se administraron 2 secretagogos, clorhidrato de histamina y pentagastrina (Peptavlon-Ayerst) en 2 días diferentes con intervalo de 1 semana. Quince minutos antes de la inyección subcutánea de histamina, los animales fueron protegidos con 10 mg/kg de Benadryl intravenoso (Parke Davis). Durante la estimulación que se realizó con 2 inyecciones de histamina (0.04 µg/kg) o pentagastrina (32 Ucg/kg) con 30 minutos de intervalo, se recogió la secreción gástrica cada 15 minutos durante un período de 90 minutos.

Antes de comenzar el estudio se aspiró y descartó el contenido gástrico. La secreción basal fue continuamente aspirada manualmente con una jeringa de 20 ml, por 4 períodos de 15 minutos cada uno, antes de comenzar con la estimulación.

Se midió el volumen con precisión de 0.1 ml y se tituló la concentración de ácido con NaOH 0.1N hasta pH 7 en un titulador automático (Radiometer, Dinamarca).

Se estudió dos veces en cada mono la secreción gástrica estimulada por cada secretagogo y se promediaron los resultados.

La secreción ácida basal (BAO) se calculó por la suma de los 4 valores obtenidos durante 60 minutos, antes de la administración del secretagogo.

El pico de secreción ácida (PAO) se calculó multiplicando por 2 los 2 valores consecutivos más altos obtenidos después de la administración de cada secretagogo.

### Estudios morfológicos

El estudio anatomo-patológico se realizó en los animales que murieron espontáneamente y los que fueron sacrificados elegidos al azar, de aquellos

infectados que mostraron alteraciones electrocardiográficas y/o ecocardiográficas,(12) durante la evolución de la enfermedad.

Se realizó la autopsia completa de los animales; el corazón y tracto gastrointestinal (con especial atención a esófago y colon), hígado, bazo y músculo esquelético fueron inmediatamente removidos y fijados en su totalidad.

El esófago y el colon fueron separados en toda su extensión, fijados y estacionados en líquido de Zamboni durante 24 hs; luego enrollados e incluidos en parafina. Las secciones obtenidas fueron coloradas con las técnicas de Hematoxilina-Eosina, el tricrómico de Masson y la reacción inmunohistoquímica para enolasa específica neural (EEN).

La determinación inmunohistoquímica (IHQ) de EEN fue realizada por el método de peroxidasa-antiperoxidasa de Sternberger (22), con el objeto de hacer evidente el plexo de Auerbach en el colon y el esófago. En resumen, las secciones fueron incubadas con suero de conejo contra enolasa específica neural (Dako) diluido 1:500, durante 24 hs., a 4° C previa inhibición de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol absoluto. Las secciones fueron previamente lavadas en PBS e incubadas en suero de cerdo normal. Luego del incubado con el primer antisuero fueron lavadas en PBS, e incubadas en suero de cerdo contra inmunoglobulinas de conejo y luego en complejo soluble peroxidasa-antiperoxidasa (PAP (Dako)). La peroxidasa fue revelada usando el método de Graham y Karnovsky (23).

Con el objeto de valorar el grado de disminución de las áreas del plexo de Auerbach en los distintos animales, se estudiaron el esófago y el colon.

Para tal fin se dividieron el esófago y el colon según su eje longitudinal en dos mitades las que denominaremos D y E (Fig. 1)

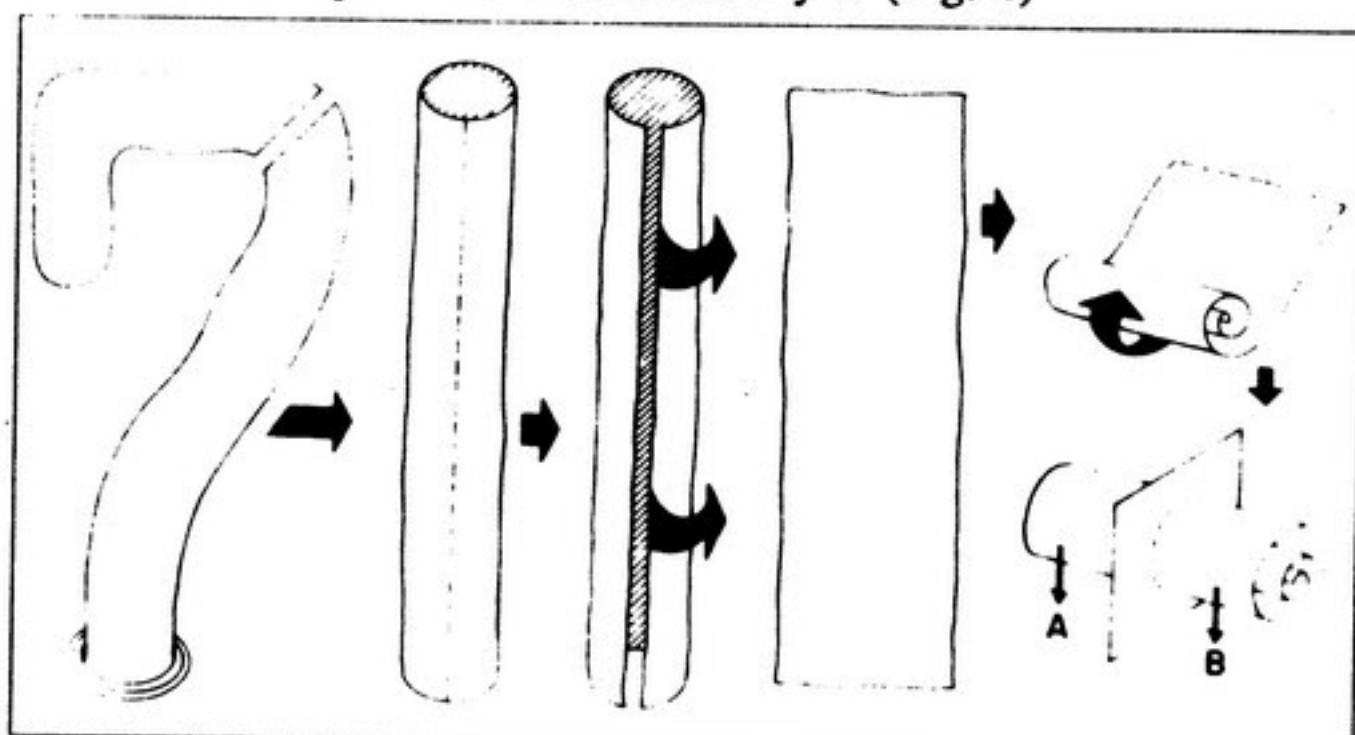
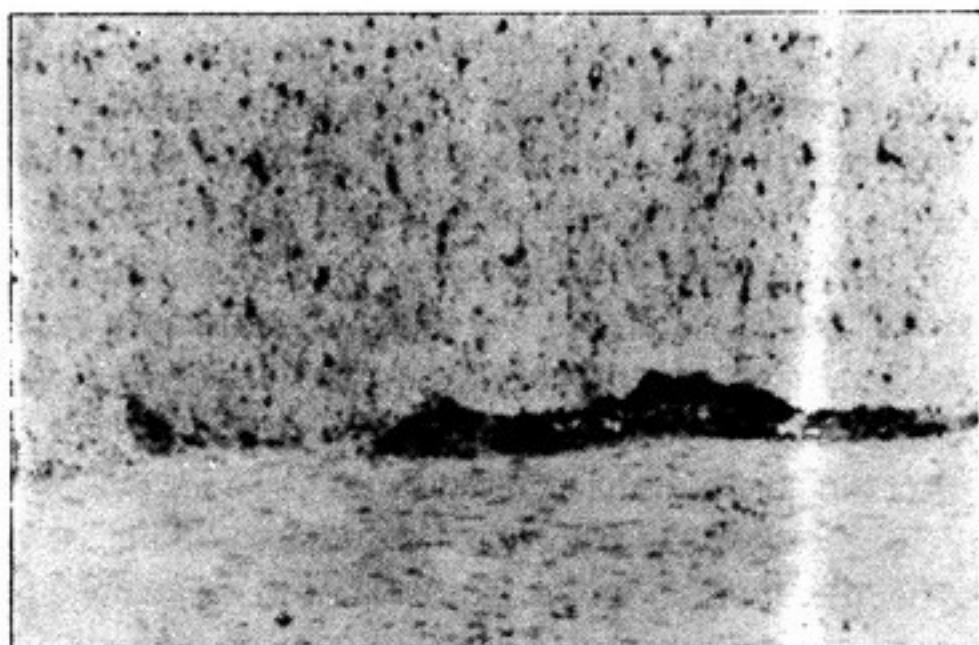


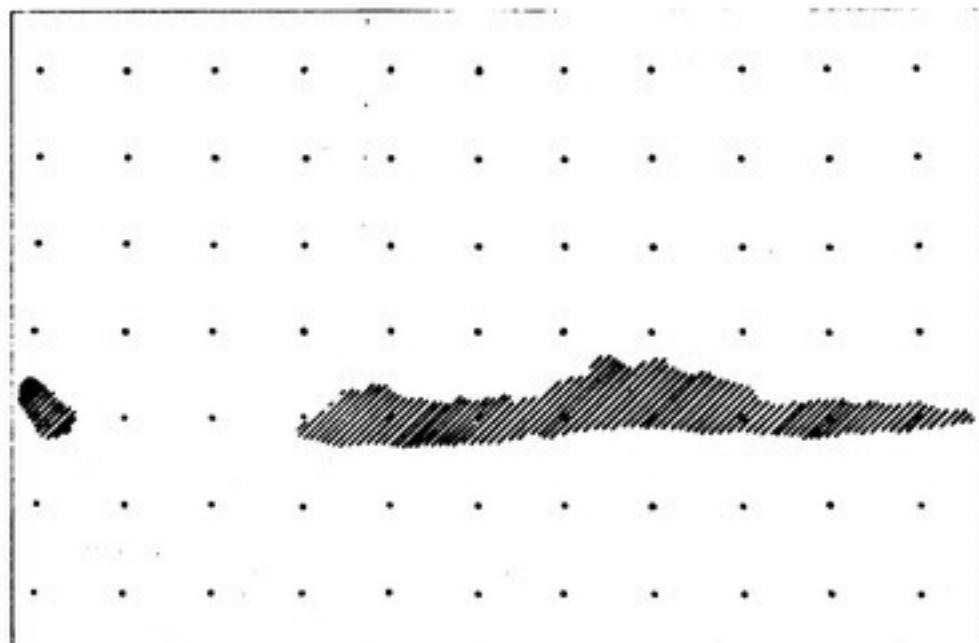
Fig.1: Esquematización del método utilizado para el estudio del colon y esófago mediante enrollado.

En estas secciones se procedió a la proyección de las imágenes mediante prisma y espejo de reflexión total sobre papel, en el cual se dibujó la imagen proyectada. Dado el predominio lesional en el tercio inferior de ambos órganos, observado por microscopía óptica, se dibujaron 20 campos sucesivos de distal a proximal comenzando en el primero supracardial, marcando el área correspondiente al plexo de Auerbach en las proyecciones que aparecía. Estas proyecciones fueron realizadas mediante un microscopio Zeiss modelo GFL con objetivo de 40x, objetivo de 1.6 y ocular de 10x.

Sobre los dibujos se procedió al análisis estercológico (24) mediante grilla de puntos. Se procedió a 3 tiradas en la grilla al azar sobre cada uno de los dibujos y se sumaron los puntos que coincidían sobre las áreas positivas (Fig. 2a-2b).



**Fig.2a:** Sección de colon de un mono control en la que se observa marcada por anticuerpo anti-EEN el área correspondiente al plexo de Auerbach (IHQ para EEN 100x)



**Fig. 2b:** Método utilizado para calcular el área correspondiente al plexo de Auerbach de la fotomicrografía 2a, sobre la que se colocó la grilla de puntos.

### Estudio estadístico de la secreción gástrica

Los resultados se expresaron como  $X + ES$  y se indican solamente las diferencias significativas entre grupos (prueba de t).

### Estudio estadístico de resultados de enolasa

Con los resultados obtenidos por la grilla de puntos, se confeccionó una tabla en la que constaban las 20 lecturas de las mitades D y E de cada mono (en total 2 grupos de datos por mono). Se calculó la media aritmética del total de las lecturas (2 por mono) de los cuatro monos controles ( $n = 8$ ). Se consideró como valor bajo a aquéllos ubicados por debajo de  $X - 2 DS$ , y normal a aquéllos ubicados entre  $X + 2 DS$ . Se estudió cuántas lecturas de los inoculados y controles se encontraban por debajo del rango normal establecido para luego efectuar la prueba del CHI<sup>2</sup>.

## RESULTADOS

### Estudios Preliminares

En los 3 grupos de animales infectados con *T. cruzi*, se detectó parasitemia positiva por la gota fresca, test de Strout y/o xenodiagnóstico. La serología específica determinada por HAI y ELISA se hace positiva a la cuarta semana post-inoculación bajando a partir de la semana 49 (11).

En la etapa crónica, se observaron alteraciones en el ECG en todos los animales excepto los del grupo control (Fig. 3 y 4) compatibles con las descriptas en patología humana (25-26), excepto en 1 mono inoculado con la cepa CA1 en el cual no se observó trastornos (13). El 100% de los animales presentó alteraciones ecocardiográficas (12).

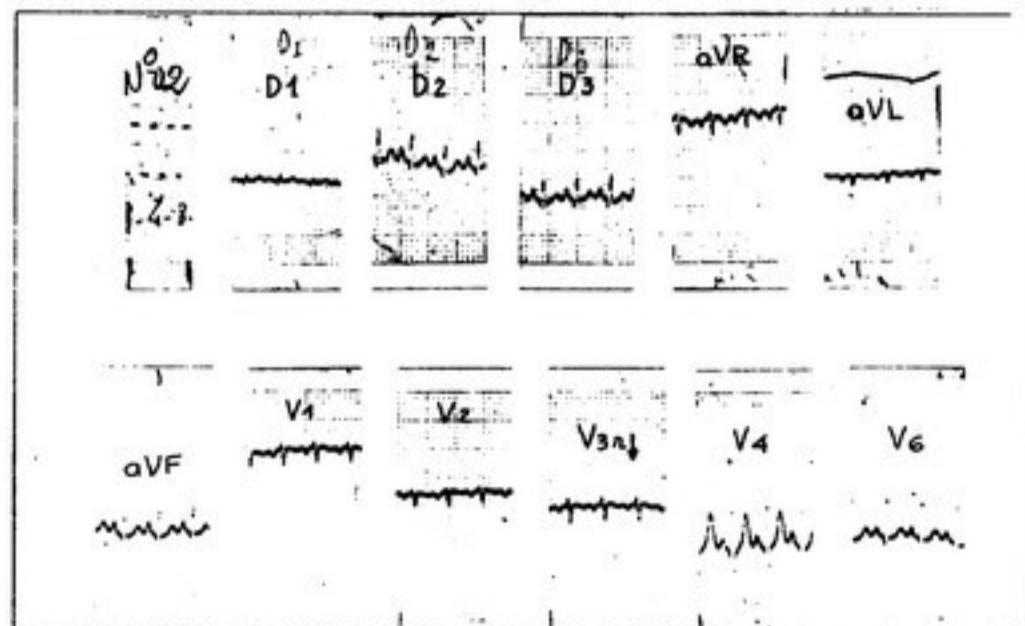


Fig. 3: Trazado electrocardiográfico normal en un mono control, bajo efecto anestésico (Ketalar Parke Davis 10 mg/kg)

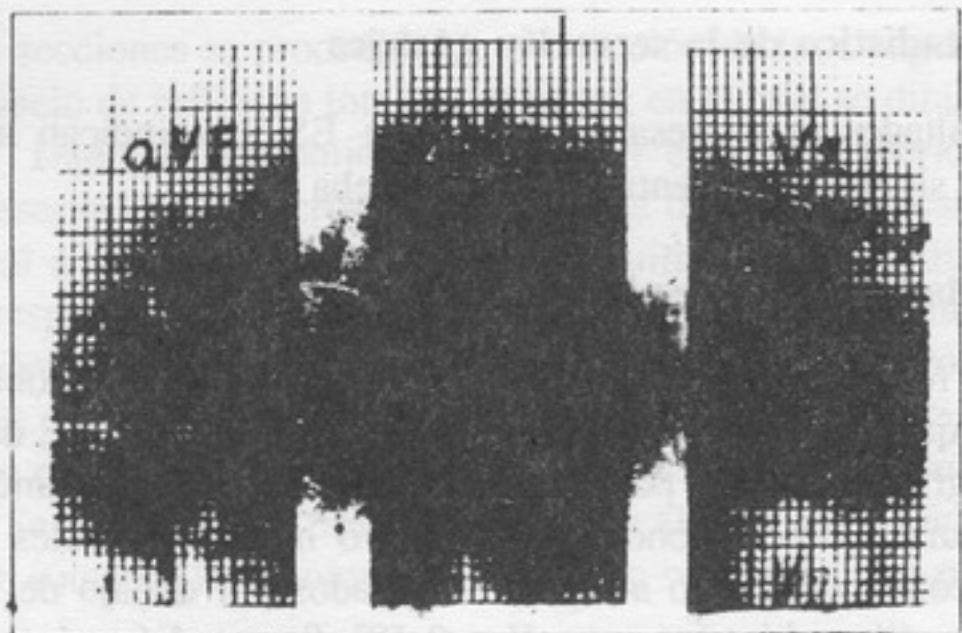


Fig. 4: Trazado electrocardiográfico de un primate infectado con *T. cruzi* (cepa Tulahuén), bajo efecto anestésico en el cual se observa un bloqueo de rama derecha.

### Radiología

Ninguna alteración fue observada en el grupo control en cuanto al diámetro, longitud y motilidad del colon y esófago.

De los 12 monos del grupo infectado, estudiados anatopatológicamente y que presentaban alteraciones ECG y ecocardiográficas, tres mostraron un alargamiento y dilatación del colon en los estudios contrastados (Fig. 5 y 6). En todos los casos la alteración radiológica fue corroborada histopatológicamente, y fueron halladas las lesiones del plexo mientérico responsables de la dilatación.



Fig. 5: Radiografía contrastada de colon de un mono del grupo control, en la cual se puede apreciar el diámetro y la longitud normal, observada en esta especie.



Fig. 6: Radiografía contrastada de colon de un mono infectado con *T. cruzi* (cepa CA1), en la cual se observa claramente una imagen compatible con megavíscera.

### Secreción Gástrica

El BAO ( $X + ES$ ) fue de  $0.22 + 0.04 \text{ mmol} \times \text{h}^{-1}$  en el grupo control y no difirió significativamente de los valores infectados con CA1, T y C cuyos valores absolutos fueron  $0.21: 0.21 + 0.04 \text{ mmol} \times \text{h}^{-1}$ ,  $0.28 + 0.07 \text{ mmol} \times \text{h}^{-1}$ ,  $0.15 - 0.04 \text{ mmol} \times \text{h}^{-1}$ . Los resultados de PAO en respuesta a la histamina y a la pentagastrina para los 4 grupos comparados con los valores de BAO se muestran en la Figura 7.

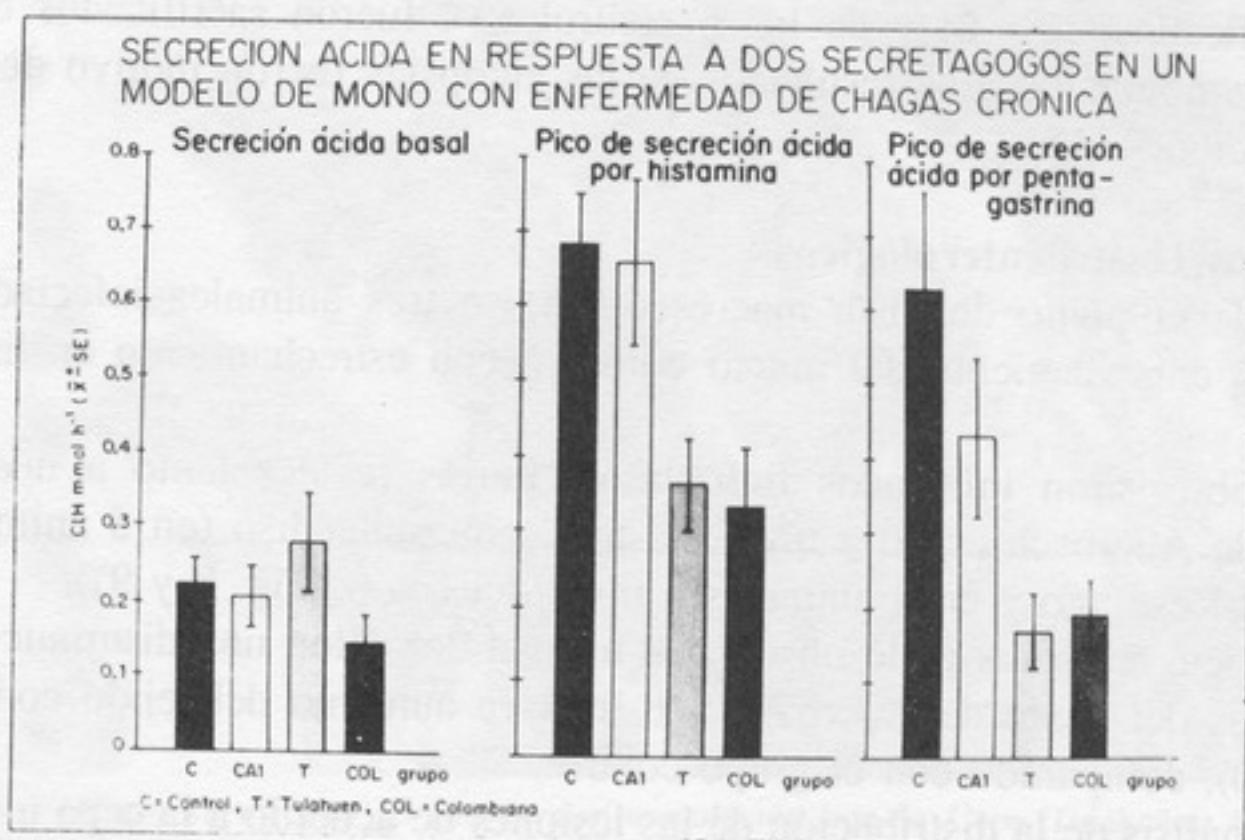


Fig. 7: Gráfico comparativo de los estudios secretorios realizados en los grupos control e infectados (cepa CA1, Tulahuén y Colombiana) con histamina y pentagastrina.

### **Pruebas de histamina y pentagastrina**

No hay diferencias entre los valores promedios de PAO del grupo control, correspondientes a ambos secretagogos, que fueron de  $0.68 + 0.09 \text{ mmol} \times \text{h}^{-1}$  para la histamina y  $0.63 + 0.13 \text{ mmol} \times \text{h}^{-1}$  para la pentagastrina, que tuvieron un incremento significativo del 209% y 186% respectivamente con relación al valor basal.

El PAO fue significativamente menor ( $p<0.01$ ) para la cepa Tulahuén y Colombiana ( $p<0.05$ ) que en el control para ambos secretagogos y que en la CA1 ( $p<0.05$ ) para la histamina.

En el grupo infectado con Tulahuén, la administración de pentagastrina produjo valores de PAO significativamente menores ( $p<0.05$ ) que los producidos por la histamina, siendo los valores respectivos de  $0.17 + 0.05 \text{ mmol} \times \text{h}^{-1}$  y  $0.36 + 0.07 \text{ mmol} \times \text{h}^{-1}$ . La figura 7 resume los resultados obtenidos.

### **Hallazgos morfológicos**

#### **Aspectos cardíacos**

Desde el punto de vista anatómico el estudio "in situ" muestra para el corazón una localización vertical en relación al eje longitudinal similar al longitudinal humano.

Desde el punto de vista microscópico, la morfología cardíaca es similar a la descripta en humanos tanto para el tejido contractil como para el sistema de conducción (27).

Doce animales infectados fueron autopsiados, (muerte espontánea:  $n = 6$  y sacrificados:  $n = 6$ ) y de los 6 controles, 4 fueron sacrificados en los mismos momentos. Los resultados de las autopsias fueron motivo de otras publicaciones (15).

#### **Aspectos Gastroenterológicos**

Desde el punto de vista macroscópico, en tres animales infectados se observó engrosamiento del marco colónico con estrechamiento en la zona rectal.

Se observaron infiltrados linfoplasmocitarios focales tanto a nivel del plexo de Auerbach como a nivel del tejido muscular liso (en 5 animales a nivel del esófago y en 3 animales a nivel del colon (Fig. 8 y 9)).

En siete animales pudo observarse a nivel del colon una disminución de las áreas del plexo de Auerbach con un leve aumento del tejido conectivo (fig. 10), comparado con el grupo control.

El análisis de la distribución de las lesiones de acuerdo a la cepa utilizada (Tabla II) mostró una predominancia de lesiones de tipo agangliósico a nivel

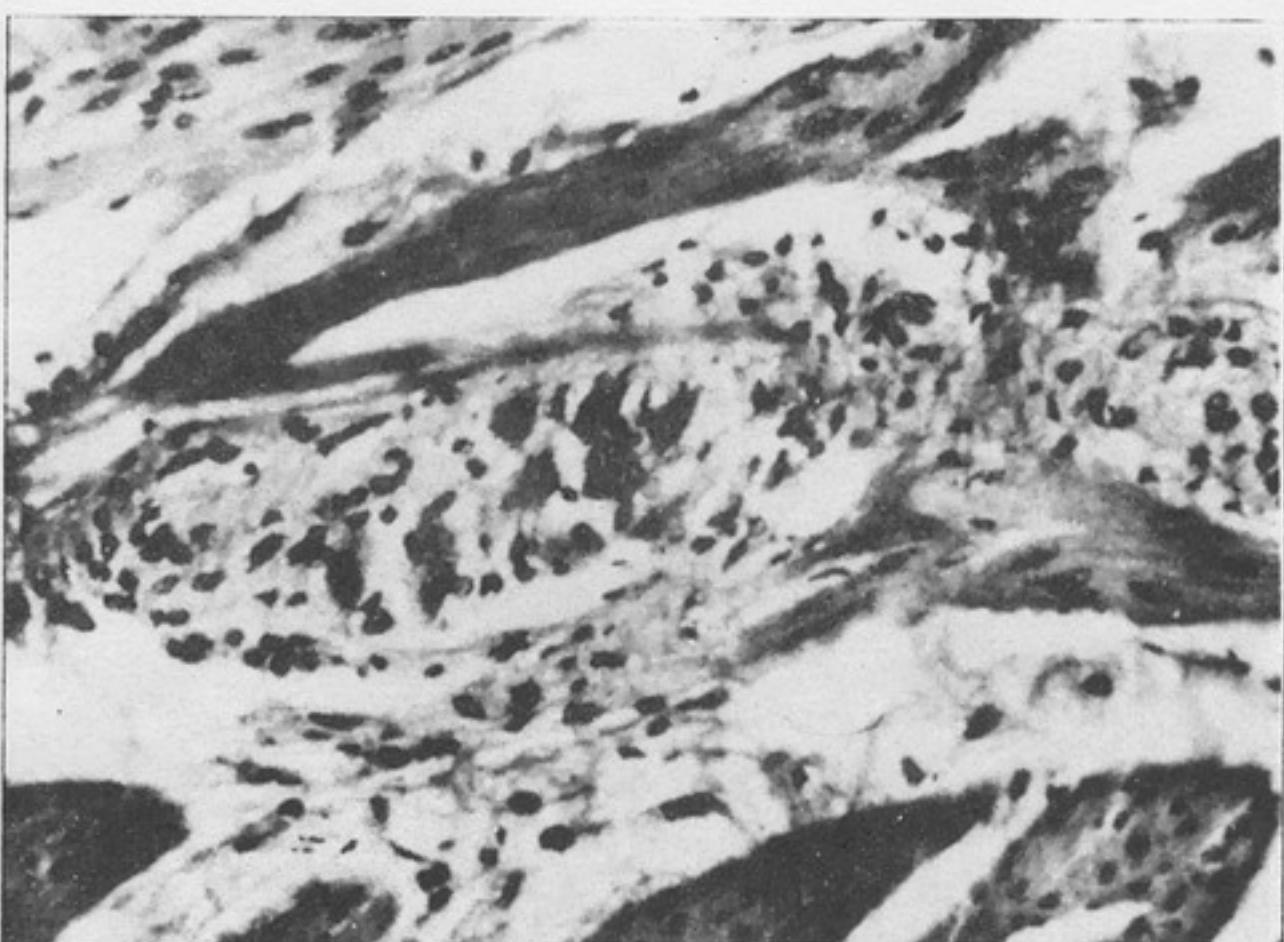


Fig. 8: Mono sacrificado 25 meses post-inoculación con la cepa Tulahuén. Se observa a nivel esofágico plexo de Auerbach en el que sus neuronas se hallan rodeadas de linfocitos e infiltración de estos entre las fibras nerviosas (HE 100x)

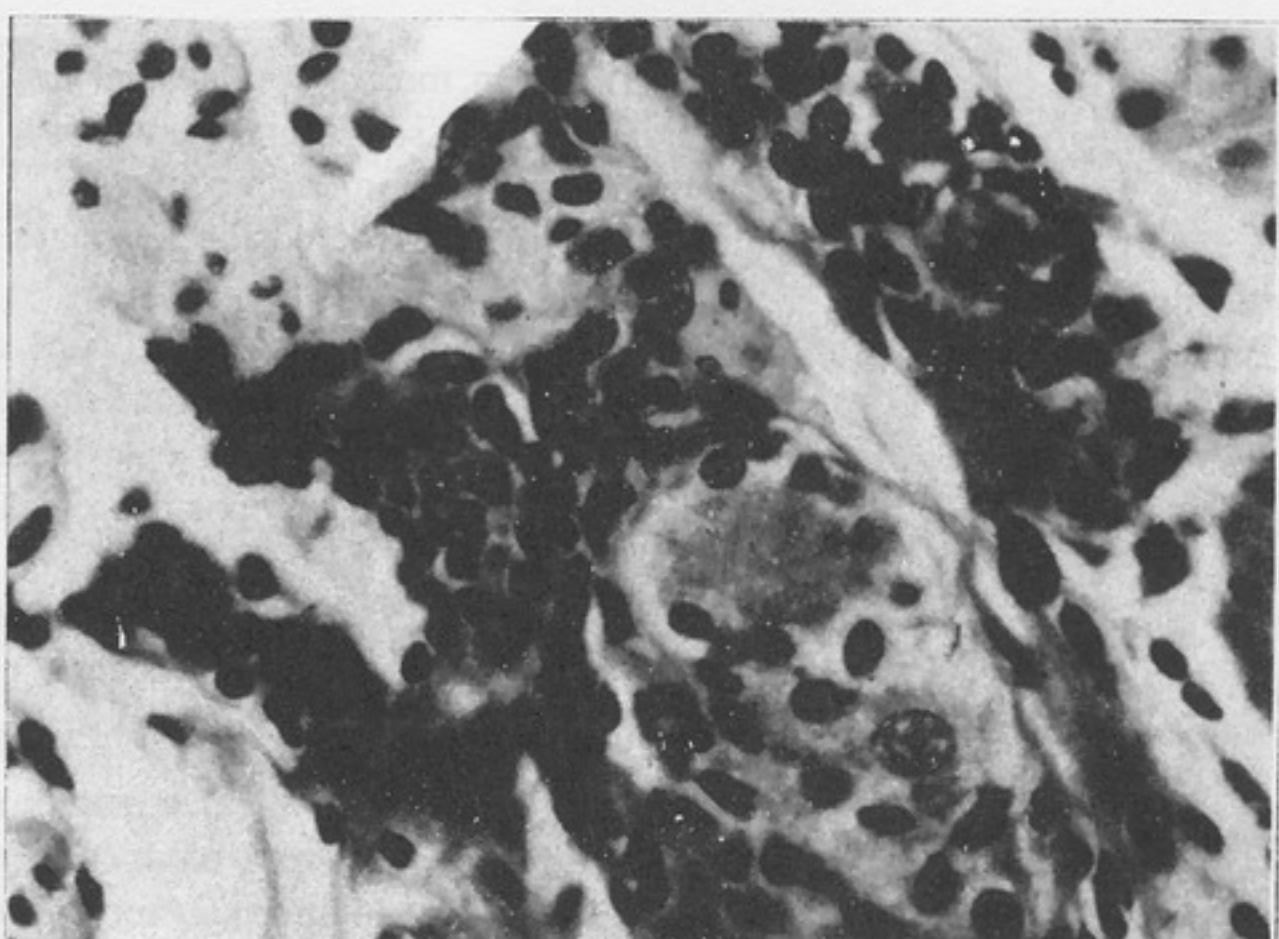


Fig. 9: Mono sacrificado 25 meses post-inoculación con la Cepa Tulahuén. A nivel de la musculatura propia del colon se observan las neuronas y fibras nerviosas del plexo de Auerbach rodeadas por linfocitos (HE 100x)

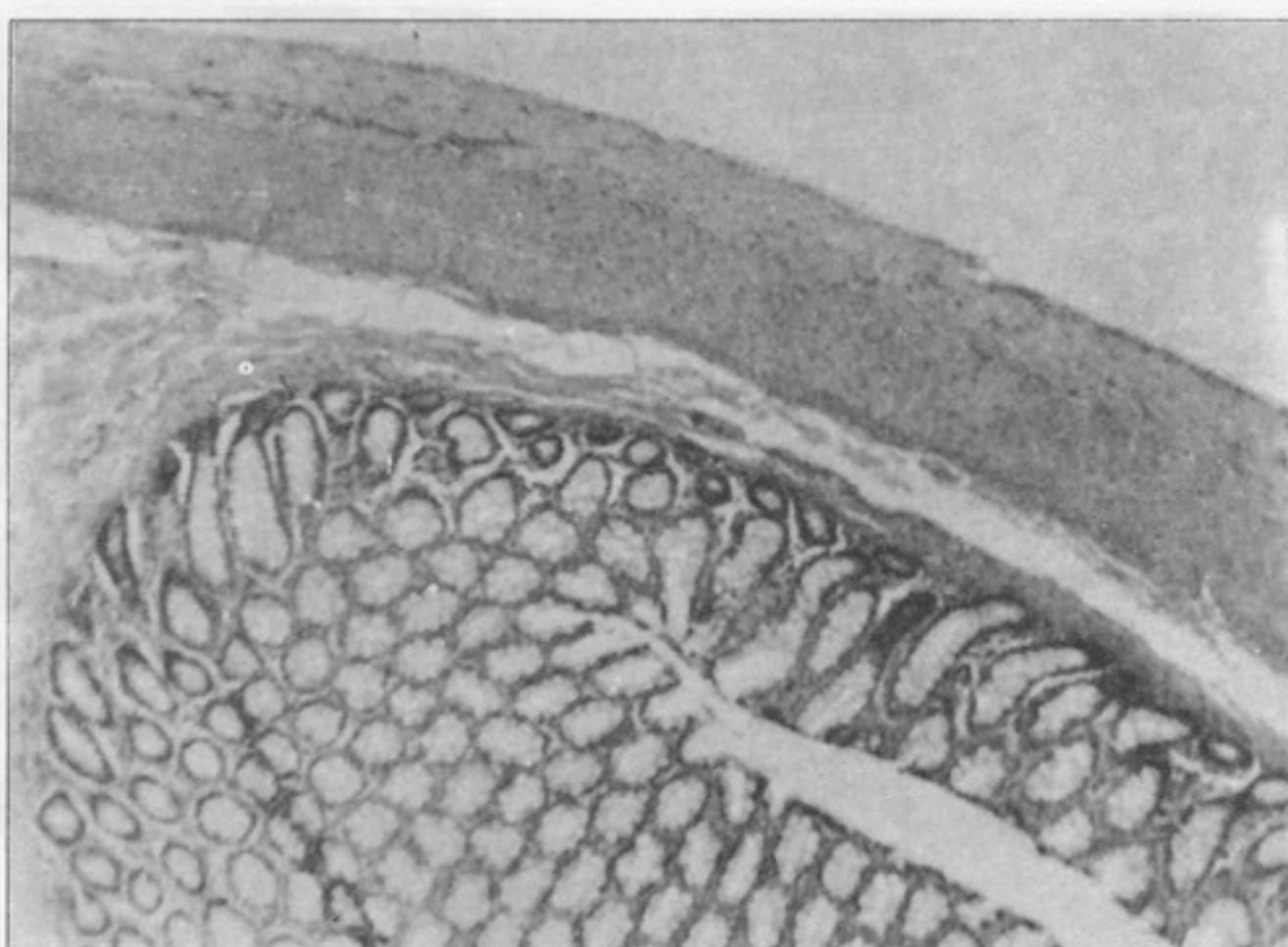


Fig. 10: Mono sacrificado 46 meses post-inoculación con la cepa Tulahuén. La imagen muestra el colon que a nivel de la musculatura propia presenta una franca disminución de los elementos del plexo de Auerbach (HE 40x)

del colon en la cepa CA1. La cepa Tulahuén mostró lesiones infiltrativas tanto en esófago como en colon, aunque también se vio una agangliosis leve en los dos animales con mayor tiempo desde la primera inoculación.

La cepa Colombiana fue la que mostró menor repercusión lesional en el aparato digestivo.

Con respecto a la topografía lesional, independientemente de la cepa utilizada, (Tabla III), en 4 (33%) animales fueron encontradas únicamente lesiones colónicas, mientras que en 5 (42%) pudieron encontrarse lesiones en colon y esófago, lo que determina que de un total de 12 monos necropsiados, 9 (75%) mostraban lesiones del tubo digestivo.

En los animales que murieron espontáneamente, se pueden observar un mayor número de lesiones esofágicas, y un aumento no significativo en el número de lesiones colónicas, en relación a los monos sacrificados.

#### **Estudio Estereológico:**

##### **Colon:**

- Monos controles (n=4): ninguno de ellos presentó valores de lectura bajos ( $<X-25D$ ), implicando que el 100% de los monos controles ingresaban en el rango normal.

- *Monos inoculados (n=12): del total de monos inoculados, 3 (35%) de ellos mostraron valores dentro del rango normal y 9 animales (75%) por lo menos mostraron un valor bajo (p < 0.02).*

#### **Estudio de acuerdo a la cepa:**

**Cal** (n=6) todos los animales inoculados con esta cepa presentaron como mínimo un valor bajo en las diferentes lecturas ( $p < 0.001$ ). T (n=3) dos (67%) de los monos presentaron, al menos, un valor bajo. El restante (33%) presentó lectura dentro del rango normal (n.s.).

**C** (n=3) dos (67%) de los casos presentaron lecturas dentro del rango normal y en un solo caso (33%) se observó una lectura de valor bajo (n.s.).

#### **Esófago**

- *Monos controles (n=4): ninguno de ellos presentó valores de lectura bajos, implicando que el 100% de los monos controles ingresaban en el rango normal.*
- *Monos inoculados (n=12): ninguno de ellos presentó valores de lectura bajos, independientemente de la cepa estudiada.*

#### **Estómago**

De los 8 estómagos estudiados histológicamente, se halló una gastritis crónica superficial en 3 de ellos, en los que se observó un infiltrado mono-nuclear en la lámina propia superficial, siendo más importante a nivel de la región antral. En los 5 estómagos restantes, no se encontró lesión.

### **DISCUSION**

El corazón y el tracto digestivo son los más frecuentemente afectados por el *T. cruzi* en humanos (28,29) y también en este modelo de primate (12, 13, 14, 15). En el aparato digestivo, los órganos más frecuentemente involucrados son el esófago y el colon.

Etzel (30), en 1935, estudiando la secreción ácida basal en la enfermedad de Chagas, observó una alta frecuencia de pacientes con aclorhidria, llamando la atención la falta de un patrón uniforme de secreción ácida en esos pacientes. Varios autores confirmaron los hallazgos de Etzel. Esto puede ser explicado por una variable destrucción de nervios intramurales (31,32).

De acuerdo con la hipótesis de Grossman (33) las células parietales tienen un receptor para la acetil-colina, diferente al de la gastrina, y un tercero para la histamina. Como consecuencia de la destrucción nerviosa, en pacientes con

enfermedad de Chagas puede haber un deterioro del tono y la estimulación vagal, así como también una posible lesión a nivel del receptor.

En nuestra experiencia, la secreción basal no fue influenciada por estos factores, a diferencia de otras comunicaciones (34). Otros autores encontraron valores bajos (32). Pero el patrón variable de estimulación en estos monos con el uso de la histamina o pentagastrina en el grupo infectado con la cepa Tulahuen puede ser explicado por una destrucción focal diferente del sistema nervioso autónomo. En el grupo inoculado con cepa CA1, que tiene un patrón de secreción normal con ausencia de lesiones histológicas esofágicas, es posible suponer que una menor virulencia de la cepa, la utilización de un inóculo menor, o una vía diferente y frecuencia de inoculación (1 ó 2 inoculaciones), son las causas de ausencia de lesiones e hiposecreción o que se necesite un mayor período para la manifestación de la injuria a nivel del esófago y su repercusión funcional a nivel secretorio.

### Comparación con otros modelos animales

La necesidad de un modelo de Chagas crónico y particularmente de la patología cardíaca y gastrointestinal chagásica es una prioridad que el Programa de Enfermedades Tropicales de la Organización Mundial de la Salud ha impulsado por varios años para poder progresar en el conocimiento de la inmunopatogénesis de la fase crónica.

Se acepta en general, que la infección experimental con *T. cruzi* de un grupo de animales de diferentes especies puede producir índices de mortalidad que varían en función de factores inherentes al huésped (especie, edad, sexo, factores genéticos, condiciones de nutrición, etc) y el inóculo (dosis, ruta, cepa, frecuencia de la infección).

A diferencia de otros modelos animales, los monos *Cebus* mostraron durante el curso de la infección, independientemente de la cepa utilizada, conversión serológica con títulos positivos de anticuerpos específicos, detectados con HAI o ELISA. Se detectó parasitemia positiva en todos los animales durante la fase aguda, pero no en la crónica al igual que en el humano (35).

Durante el seguimiento de cinco años, los animales controles no presentaron alteraciones del ECG ni espontáneas ni por efectos anestésicos, lo que hace que este animal sea particularmente diferente de otros modelos experimentales usados generalmente (6, 7, 8, 9, 36, 37, 38).

No se puede comparar el modelo desde el aspecto gastroenterológico con otros, porque las descripciones son sólo de la etapa aguda, y las de la etapa crónica hacen mención preferentemente a los aspectos cardíacos.

## CONCLUSIONES

Los resultados observados con histamina y pentagastrina en los monos chagásicos sugieren una sensibilidad disminuida de las células parietales.

Además, el hecho de que las células ganglionares del esófago estén involucradas, constituye un modelo único de denervación del sistema autónomo para el estudio de la influencia de la inervación intrínseca sobre las funciones gástricas.

Debemos tener en cuenta que esos resultados se correlacionan exactamente con otras alteraciones patológicas observadas en estos animales como consecuencia de la infección crónica por diferentes cepas de *T. cruzi* (11, 13, 15). Así por ejemplo, los grupos de animales infectados con cepas Tulahuén y Colombiana, que produjeron lesiones a nivel de esófago y de colon, presentaron una respuesta de secreción ácida gástrica disminuida; en cambio, se mantenían a los niveles de secreción gástrica dentro de los límites normales en el grupo infectado con la cepa CA1, el cual no presentaba lesiones histológicas en esófago, pero sí en el colon, con imágenes radiológicas de dilatación.

Es de interés destacar que, como resultado de anomalías en la inervación del sistema autónomo, las megavísceras producidas por la infección del tripanosoma cruzi pueden ser consecuencia de alteraciones en las terminaciones peptidérgicas del VIP y Sustancia P, que están francamente disminuidas en las zonas de hipo o agangliosis de pacientes con enfermedad de Hirschsprung (39). Estos hallazgos en el humano nos han impulsado a analizar esta posibilidad habiendo iniciado las investigaciones correspondientes.

Estos resultados también nos estimulan a continuar el estudio sobre motilidad gastrointestinal esofágica y colónica, las que deberían estar disminuidas como consecuencia de la destrucción nerviosa, según lo observado por otros autores en humanos (40).

Los infiltrados observados en el plexo de Auerbach, tanto en esófago como en colon, en 2 animales con una corta evolución (21 y 25 meses post-infección) y el megacolon detectado radiológica y macroscópicamente en otros 3 animales (46 a 67 meses después de la infección) con marcada disminución de los elementos neuronales del plexo, muestran claramente el daño del sistema nervioso autónomo.

La destrucción del plexo en el hombre no siempre es acompañada por megavíscera, la que se encuentra en el 3 al 59% de los casos con cardiompatía (41).

Un mayor porcentaje puede presentar lesión neuronal con disminución de las células ganglionares.

En este modelo, las lesiones cardíacas y gastrointestinales son independientes de la edad, sexo y peso del animal y se observaron una fase indeterminada más bien larga, como ocurre en el hombre, quien desarrolla lesiones varios años y aun décadas después de ser infectado, y una fase crónica que comienza 2 a 3 años después de la infección.

El hecho de que el 100% de los animales sobrevivan a la fase aguda y que las lesiones histopatológicas cardíacas y gastrointestinales sean similares a las del hombre, permitiría la extrapolación a las condiciones y mecanismos de la infección natural humana.

Los animales infectados con las cepas Colombiana y Tulahuén en forma repetida, usando la vía i.p. y con un número mayor de parásitos que con la cepa CA1, mostraron lesiones histopatológicas en un tiempo más breve, (21 a 25 meses post-infección, cepas Colombianas y Tulahucn) que los que recibieron 1 ó 2 inoculaciones (46-67 meses post-infección, cepa CA1).

El estudio estercológico del colon muestra una disminución de las áreas correspondientes al plexo de Auerbach en un porcentaje de animales que varía para las distintas cepas inoculadas. Esa disminución es significativa para la CA1, pero no para la Tulahuén y la Colombiana, aunque no se descarta que de aumentar el número de casos estudiados para estos grupos, podría también cambiar la significación.

La negatividad de los resultados del estudio de los plexos esofágicos con EEN puede deberse a la ausencia de disminución de los plexos, porque no fue suficiente para realizar una lesión el tiempo transcurrido entre la primera inoculación y la realización del estudio. Además, fisiopatológicamente, la disminución de la función esofágica está en relación con la difusión de la lesión a nivel neuronal. La anatomía patológica en microscopia óptica mostró sólo infiltrados que indicarían únicamente inicio de lesión. Otra de las causas de negatividad es que el esófago se altera en forma más tardía que el colon, tal como sucede en la infección crónica en humanos.

### **Utilidad del Modelo**

En consecuencia, el *Cebus apella*, un primate del Nuevo Mundo, nativo de un área endémica, que se reproduce bien en cautiverio, que se adapta a las condiciones de una colonia interna y puede ser mantenido a costo razonable, sería, de acuerdo con los requisitos propuestos por Brener (42), un modelo adecuado para el estudio de la enfermedad de Chagas en su etapa crónica; de los efectos producidos por la denervación del sistema autónomo se dilucidan las causas que producen las alteraciones histopatológicas, al permitirnos estudiar la evolución natural de esta enfermedad, al reproducir las alte-

raciones histopatológicas similares a las descriptas en el humano, en un corto tiempo después de la infección experimental.

El uso de este primate, que está al alcance de los investigadores de las áreas endémicas, en forma multidisciplinaria y coordinada, nos permitirá progresar en el conocimiento de la patogénesis e inmunopatología de esta enfermedad. Permitirá también la evaluación de los efectos de nuevos inmunógenos y quimioterápicos.

Esta patología, todavía desconocida y difícil de tratar, continúa siendo, como Chagas dijo, uno de los problemas médico-sociales más importantes y serios de las áreas rurales en Latinoamérica, donde millones de personas son infectadas. Sin embargo, actualmente, es también un serio problema de las zonas urbanas, dado que su frecuencia aumenta, debido a las migraciones internas y la transmisión transfusional por dadores chagásicos no detectados.

Los tratamientos disponibles están lejos de ser satisfactorios y una vacuna podría no ser posible por mecanismos convencionales.

Estamos obligados a unir esfuerzos y conducir nuestros recursos e investigaciones con una sincera autocrítica y evaluación permanente de los resultados.

TABLA I

DISEÑO EXPERIMENTAL

CEPA MATERIAL Y METODO	CA 1	COLOMBIANA	TULAHUEN	CONTROL
Número de animales	10	4	4	35
Sexo	machos	2 machos - 2 hembras	machos	machos
Edad estimada a la 1 <sup>a</sup> inoculación (años)	6-10	1,2-3	4-4,5	5-9
Peso (g)	2110-3320	940-1800	1660-1950	2250-2570
Fecha de la 1 <sup>a</sup> inoculación	06-80 a 07-81	09-82 a 12-82	11-82 a 12-82	—
Número de inoculaciones	1 o 2	17 o 18	10 o 11	—
Número de T CRUZI por inoculación	$4 \times 10^4$ y/o $1 \times 10^6$	$3 \times 10^6$	$3 \times 10^6$	—
Vía de inoculación	conjuntival	I.p.	I.p.	—

TABLA II

**TIPO de LESIÓN en Función del Tiempo Post-Inoculación y Cepa de T. Cruzi**

		ESOF.	COL.	COR.
CA1	I 46m	—	Ag.L	MF.M
	N 46m	—	Ag.M	MF.L
	M 46m	—	—	MF.L
	O 53m	—	Ag.L	MF.L
	K 58m	—	Ag.L	MF.M
	67 m	Inf.	Ag.L	MF.L
TUL	D 25m	Inf.L	Inf.L	IG
	C 40m	Inf. Musc.	Ag.L	MF.L
	49 m	Inf. Musc.	Ag.L Inf.	MF.L
COL	G 21m	—	—	IG
	E 21m	Inf. Musc.	Inf. Musc.	IG
	H 48m	—	—	MF.L

Inf = infiltrados

I.G = lesión infiltrativa granulomatosa

Musc = muscular

MF = lesión miocitótica fibrosa

Ag = agangliosis

L = leves

M = moderado

TABLA III

**TOPOGRAFIA LESIONAL en Función de la Cepa de T. Cruzi**

Cepa	Sacrificados n=6		Muertes Espontáneas n=6		Animales c/ lesión
	Esófago	Colon	Esófago	Colon	
CA1 n=6	-	2	1	3	(83%)
TUL n=3	1	1	2	2	(100%)
COL n=3	1	1	-	-	(33%)
Total	2	4	3	5	
%	25	75	50	85	75

## Bibliografía

- "Pan American Health Organization. Report of a study group on Chagasi disease", en **Pan Am Health Org. Sci.** 1970, Publ. No. 195.
- PUIGBO, J. "Chagas' heart disease: clinical aspects", en **Cardiología**, 1968, 52: 91-96.
- ANDRADE Z.A. "Aspectos Patológicos de docencia de chagas", en **Interciencia**, 1988, 8: 367.
- KOBERLE, F. "Chagadisease and Chagas'syndromes: the pathology of American trypanosomiasis". In: Dawes A., ed. **Advances in parasitology**. Vol. 6, London, Academic Press, 1968: 63-116.
- EDGCOMB, J. H. and JOHNSON, CM. **American Trypanosomiasis (Chagas' Disease). Pathology of Tropical and Extraordinary disease**. Ed. Capman H. Binford, M.D. and Daniel H. Connor, M.D. 1976.
- REVELLI, SS; AMERIO, N; MORENO, HS; VALENTI, JL; BALBARREY, H.; MORINI, JC. "Enfermedad de Chagas crónica en la rata. Características serológicas, electrocardiográficas e histopatológicas", en **Medicina**, (Buenos Aires), 40 (supl. 1), 69-76.
- LAGUENS, RP.; MECKERT, PC and GELPI, RJ. "Chronic Chagas' disease in the mouse. I. Electrocardiographic and morphological patterns of the cardiopathy", en **Medicina**, (Buenos Aires), 1981, 41, 35-39.
- MARSDEN, P. and HAGSTRIM, J.W.C. "Experimental Trypanosoma cruzi infection in beagle puppies. The effect of variations in the dose and source of infecting trupanosomes and the route of inoculations on the course of the infection", en **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 1968, 62: 816.
- FIGUEIREDO, F., MARIN-NETO, J.A. and ROSSI, M.A., "The evolution of experimental Trypanosoma Cruzi cardiomyopath in rabbits: further parasitological, morpholigical and functional studies", en **Int. J. Cardiol.**, 1986, 10: 277-290.
- GILI, M., MARESO, E., GRANS, D., MERLO, A., GOMEZ, E y FALASCA C.A. **Alteraciones ecocardiográficas (modo M) en un primate no humano (Cebus apella) con infección natural crónica por tripanosoma cruzi**. Premio Capítulo Cardiología V Congreso Latinoamericano de Ultrasonografía en Medicina y Biología. Uruguay, Vol. 3, No. 2, 96-102, 1989.
- FALASCA, C.A., GILI, M., GRANA, D., MARESO, E.A. et al. "Susceptibility of the Cebus apella Monkey to Different Strains of T. cruzi after Single or Repeated Inoculations", en **Bulletin Pan American Health Organization**. 1986; 20(2): 117-137.
- GILI, M., GRANA, D., GARCILAZO, E., FALASCA, C.A. "Alteraciones electro y ecocardiográficas (Modo M) en un modelo experimental crónico de enfermedad de Chagas, el primate Cebus apella", en **Medicina**, (Bs. As.), 1986; 46 (5): 553.
- GILI, M.; GRANA, D.; MARESO, E., GARACILAZO, E. and FALASCA, C.A. "Electrocardiographic changes in chronic T. cruzi infected Cebus apella monkey". Aceptado para publicar en **Arquives Brasileiros de Cardiología**, Setiembre, 1990.

## 300 - INVESTIGACIONES

- FALASCA, C.A., y MARESO, E.A. **Un modelo experimental en un primate del nuevo mundo, para el estudio de la cardiopatía chagásica crónica.** Premio WELLCOME de Investigación en Medicina Interna, 1985. Asociación Médica Argentina. Buenos Aires. Argentina.
- FALASCA, C.A., GILI, M., GRANA, D., GOMEZ, E., ZOPPI, J. MARESO, E. "Chronic Myocardial Damage in Experimental *T. cruzi* Infection of a New World Primate, *Cebus* sp. monkey", en *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 32: 151-161, 1990.
- EIGUCHI DE PALMERO, K., CARBONETTO, Ch., MALCHIODI, E.L., MARGNI y FALASCA, C.A. "Humoral and Cellular Parameters of the immune system of *Cebus apella* monkeys. Cross reactivity between monkeys and human immunoglobulins", en *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 19:341-349, 1988."
- FALASCA, C.A. "Parámetros electrocardiográficos y ecocardiográficos, en el primate *Cebus apella*, un modelo experimental crónico, para la enfermedad de Chagas", en *Boletín de la Academia Nacional de Medicina*, Buenos Aires, 1985, 63: 179-182.
- GRANA, D., MINO, J., MERLO, A., GOMEZ, E., SESMA, W., FALASCA, C.A. "Parámetros Normales de Laboratorio del Primate del Nuevo Mundo *Cebus apella*", en *Rev. Med. Vet.*, (Bs. As.) vol. 69 No. 3, 1988.
- STROUT, RG. J. "A method for concentrating hemoflagellates", en *J. Parasitol.* 1962; 48 (1): 100.
- BRUMPT E.O. "O xenodiagnóstico. Aplicacao do diagnóstico de algunas infecciones parasitarias em particular tripanosomiase de Chagas", en *Ann. Paul. Med. Cir.* 1974, 3:97.
- VOLLER A., DRAPER C.C., LBIDWELL, D.F. and BARTLETT, A. "Microplate enzyme. Linked immunosorbent assay for Chagas disease", en *Lancet*, 1975, 1: 426-427.
- STERNBERGER L.A. *Immunocytochemistry*, 2nd Edition. John Wiley, New York, 1979.
- GRAHAM R.C. and KARNOVSKY M.J. "The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney ultrastructural cytochemistry by a new technique", en *J. istochem. Cytochem.* 1966; 14: 291-302.
- WEIBEL, E. GAONZAGUE S. KISTLER and WALTER E. SCHERLE. "Practical Stereological Methods for Morphometric Cytology", en *The Jr. of Cell Biol.* Vol. 30, 1966: 23-37.
- ROSEMBAUM, M.B., ALVAREZ, A. The ECG in chronic chagasic myocarditis. *A.M. Heart.*, 1955, 4:50.
- CAPRIS, T.A., FERNANDEZ MOORES, A.J. "Alteraciones electrocardiográficas en la cardiopatía chagásica crónica", en *Rev. Arg. Cardiol.* 1967, 37:200.
- MILEI, J.; D. SCORDO, D.; ALONSO, E.A. MARESO, J.; ZOPPI, C.A.; FALASCA. "The conduction system in the *Cebus* monkey", en *J. Med. Primat.* (In press, 1987).
- KOBERLE, F. *Patogenia de molestia de Chagas*. CANCADA, J.R. ed *Doenca de Chagas*; pp 238-260 (Impresa Official do Estado de Minas Gerais, lkBelo Horizon-

- te, 1968).
- KOBERLE, F. and NADOR, F. "Etiologia e patogenia de magaesoago no Basil", en **Rev. Ass. Paul. Med.** 47: 643-661, 1955.
- ETZEL, E. "Megaesofago-Megacolon y sus asociaciones mórbidas", en **Rev. Cirug.** (B. Aires) 14: 631-650, 1968.
- COSTA, RB and ALCANTARA, FG. "Gastropatía Chagásica Crónica", en **Rev. Bas. Med.** 22:667-671, 196-514. Pan American Health Organization. **Report of a Study Group on Chagas' Disease.** PAHD Scientific Publication 195. Washington. D.C. 1970.
- TRONCON, L.E.A., OLIVEIRA, R.B., MENEGHELLI, U.G., DANTAS, R.O., GODOY, R.A. "Fasting and food-stimulated plasma gastrin levels in chronic Chagas disease", en **Digestion** 29:171-176, 1984.
- GROSSMAN, M.I. "The chemicals that activate the "on" switches of the oxyntic cells", en **Mayo Clin. Proc.** 50: 515-518, 1975.
- TRONCON, L.E.A., PADOVAN, W., GODOY, R.A., MENEGHELLI, U.G., DANTAS, R.O., OLIVEIRA, R.B. "Acid and pepsin secretion in chronic Chagas' disease patients in response to graded doses of pentagastrin and pentagastrin plus bethanecol", en **Digestion** 23: 48-56; 1982.
- CARRASCO, G.H., PALACIOS PRU, E.; MENDOZA, B., DARGET DE SCORZA, C. "Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas. Diagnóstico de dano miocárdico", en **Interciencia.** Vol. 8 No. 6, Nov-Dec., 1983.
- MALINOW, M.R.; DE LANNOY, C.W. "The electrocardiogram of cynopithecus niger", en **Folia primatol.** 1966, 4:66.
- KLEIN, H.O., SULLIVAN, T.A., HOFFMAN, B.F., "Ectopic atrial rhythms in the primate, A.", en **Heart J.**, 1974, 87: 750.
- BRISTOW, J.D., MALINOW, M.R. "Spontaneous bundle branch block in rhesus monkeys", en **Circulation Res.**, 1965, 16:210.
- BISHOP, A.E., POLAK, J.M., LAKE, B., M.G. Bryant and S.R. Bloom. **Abnormalities of Neural and Hormonal Peptides in Hirschsprung's disease.** Regulatory peptides, reppdy (Suppl 1) S1-S132, 1980.
- MENEGHELLI U.G., GODOY R.A., OLIVEIRA, R.B., SANTOS, J.C.M. Jr.; DANTAS R.O.; TRONCON L.E.A. "Effect of Pentagostrin on the motor activity of the dilated and nondilated sigmoid and rectum in Chagas disease", en **Digestion** 27: 152-158, 1983.
- BARBOSA, A.J.; A PRIELLA, J.E.H.; TAFURI, W.L. "Incidencia de cardiopatía chagásica em 15.000 necropsias consecutivas e sua associação com os 'megas'", en **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 1970; 4: 219.
- BRENER, Z. "Progresss recent dans le domaine de la malade de Chagas", en **Bull. Org. Mond. Sante.** 1982, 60: 845.