

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE MACACOS CEBUS APELLA SP
PELO TRYPANOSOMA CRUZI
III — VALOR DO XENODIAGNÓSTICO E DA SOROLOGIA NA
FASE CRÔNICA DA DOENÇA**

Nivaldo GRANADO (1), Maria Regina Navarro RASSY (1), Sérgio Luiz NOGAROTO (1), Silvio CARVALHAL (2), Eros Antonio de ALMEIDA (2) e Geraldo CHAIA (1)

R E S U M O

Macacos *Cebus apella sp* foram infectados com cepas de *Trypanosoma cruzi* (Y e São Felipe), e submetidos, na fase crônica da doença (1 a 5 anos de infecção), a xenodiagnósticos e testes sorológicos (aglutinação direta), revelando percentuais elevados de positividade. Ao mesmo tempo, outros macacos, não infectados, foram também submetidos aos mesmos testes, cujos resultados foram negativos. Dois dos macacos infectados foram tratados com compostos ativos, previamente testados em camundongos¹⁴ e cujos resultados parasitológicos em primatas foram concordantes com as atividades, total e parcial, dos compostos estudados. Os Autores discutem o emprego do xenodiagnóstico e de testes sorológicos como métodos de avaliação de infecção e de controle após a terapêutica e sugerem o macaco como um provável modelo para estudos de quimioterápicos na fase crônica da doença de Chagas.

I N T R O D U Ç Ã O

Aqueles que se dedicam aos estudos da quimioterapia experimental na doença de Chagas, sentem a necessidade de encontrar animais que suportem a fase crônica da doença. Embora já tenha sido assinalado o encontro de cães naturalmente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*^{19,26,31} e outros pesquisadores tenham estudado experimentalmente o comportamento da infecção chagásica em cães^{2,3,17,18,23,24} como também a ação de compostos ativos nesses animais^{1,16}, praticamente todos encontraram elevado percentual de mortalidade dos cães na fase aguda.

Na procura de outro animal que pudesse suportar a fase crônica da doença de Chagas, os Autores se propuseram a estudar o comportamento desta doença em macaco *Cebus apella sp*, facilmente encontrado em nosso meio, vi-

sando principalmente a metodologia necessária para a avaliação de quimioterápicos.

MATERIAL E MÉTODOS

I. **Seleção e infecção dos macacos** — Vinte e sete macacos *Cebus apella sp*, capturados no campo, foram selecionados para este trabalho. Dos 27 primatas, 6 foram infectados (cepa Y) sendo 5 por via intraperitoneal com formas tripomastigotas (1.10^5 a 5.10^6) provenientes de camundongos albinos, mantidos em laboratório, e o outro infectado por via palpebral com formas metacíclicas, não contadas, provenientes de *Triatoma infestans*. Dos 21 macacos restantes, um foi infectado via intraperitoneal com 1.10^5 formas tripomastigotas (cepa São Felipe), também provenientes de camundongos. Os outros 20 macacos, não infectados, bem como todos os

(1) Instituto de Pesquisa Johnson & Johnson Doenças Endêmicas, Caixa Postal 105, 13170 Sumaré, SP
(2) Pontifícia Universidade Católica, Departamento de Anatomia Patológica, Campinas, SP, Brasil

demais, foram mantidos individualmente em gaiolas no laboratório (temperatura 24-26°C, umidificação 70%). Os tripanossomos foram contados pela técnica de BRENER⁹. Do grupo dos macacos infectados, já na fase crônica da doença, 2 foram selecionados para tratamento com os compostos A-634 (macaco 6), e A-471 (macaco 7), nas doses de 125 e 80 mg/kg, por via oral, durante 50 e 60 dias, respectivamente (Tabela II).

II. **Xenodiagnóstico** — Os macacos foram sedados com Stresnil* (Azaperone 4-fluoro-4-(2-piridil)-1 piperazinil butirofenona) na dose de 0,1 ml/kg por via intramuscular e imobiliza-

dos com o ventre para cima, onde, após depilados, foram colocadas 4 caixas contendo 5 ninfas de *T. infestans*, 4.º estágio, por animal.

Após o repasto, as ninfas foram mantidas em câmara (umidificação 50-60%, temperatura 26°C), e examinadas posteriormente (30-40 dias).

O número de xenos feitos individualmente nos macacos infectados no período de 1 a 5 anos, variou de 7 a 16, e nos 20 macacos normais foram realizados 97 (Tabela I).

Nos 2 macacos (6 e 7), foram realizados, após o tratamento de 22 a 27 xenos, num período de 12 a 36 meses (Tabela II).

T A B E L A I

Resultados de xenodiagnósticos [ninfas de *Triatoma infestans*] e testes sorológicos [aglutinação direta], realizados em macacos *Cebus apella* sp, chagásicos crônicos [1 a 5 anos de infecção]

M a c a c o N.º	Infecção			Exames realizados						
	N.º de <i>T. cruzi</i> /kg	Cepa	Tempo [meses]	Período após infecção [meses]						
				12-36			48-60			
				Xenodiagnóstico e sorologia						
			N.º	Positivo	(%)	N.º	Positivo	(%)		
1	1.10 ^o	Y	60	X	12	12	100,0	16	16	100,0
				S				21	21	100,0
2	5.10 ^o	Y	60	X	14	14	100,0	9	9	100,0
				S				14	14	100,0
3	1.10 ^o	Y	60	X	12	12	100,0	7	7	100,0
				S				15	15	100,0
4	nc	Y	60	X	12	12	100,0	7	7	100,0
				S				11	11	100,0
5	1.10 ^o	SF	12	X	15	15	100,0			
				S	15	14	93,3			

Obs: Em 20 macacos normais foram realizados 97 xenos e 28 reações sorológicas, sendo todos os exames negativos.
X : Xenodiagnóstico
S : Sorologia
nc : não contado, via palpebral, fezes triatomíneo
SF : São Felipe

III. **Testes sorológicos** — Os exames sorológicos foram realizados por intermédio da reação de aglutinação direta (STORNI & col.²⁸), denominada Técnica de Yanovsky. Os testes sorológicos iniciaram-se geralmente 4 anos após a infecção, com exceção do macaco infectado com a cepa São Felipe, cujo primeiro exame ocorreu aos 15 dias. Nos animais não tratados foram realizados de 11 a 21 testes individuais com soros recentemente colhidos (24 a 48 horas, a 4°C). Em 3 dos 20 macacos normais foram realizadas 28 reações sorológicas (Tabela I).

Nos macacos 6 e 7, submetidos à terapêutica, foram realizados 3 e 4, e 21 e 16 testes sorológicos, respectivamente, antes e após o tratamento (Tabela II).

RESULTADOS

Dos 104 xenos realizados nos macacos chagásicos crônicos não tratados durante o período de 1 a 5 anos, todos os 104 foram positivos (100%), e dos 97 xenos feitos nos 20 macacos, também capturados no campo e não infectados

GRANADO, N.; RASSY, M. R. N.; NOGAROTO, S. L.; CARVALHAL, S.; ALMEIDA, E. A. de & CHAIA, G. — Infecção experimental de macacos *Cebus apella* sp pelo *Trypanosoma cruzi*. III — Valor do xenodiagnóstico e da sorologia na fase crônica da doença. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 25:283-287, 1983.

T A B E L A II

Resultados de xenodiagnósticos e reações sorológicas de macacos chagásicos crônicos, tratados com os compostos A-634 (macaco 6) e A-471 (macaco 7), nas doses de 125 e 80 mg/kg, por via oral, durante 50 e 60 dias, respectivamente.

M a c a c o N.º	Tratamento											
	Antes							Após				
	Infecção			Xenodiagnóstico e sorologia				Tempo [meses]	Xenodiagnóstico e sorologia			
	N.º de <i>T. cruzi</i> /kg	Cepa	Tempo [meses]	N.º	Positivo	(%)	N.º		Positivo	(%)		
6	5.10 ⁵	Y	30	X	16	16	100,0	36	X	27	0	0,0
				S	3	3	100,0		S	21	18	85,7
7	25.10 ⁵	Y	48	X	15	15	100,0	12	X	22	18	81,8
				S	4	4	100,0		S	16	13	81,2

X = Xenodiagnóstico

S = Sorologia

no laboratório, todos foram negativos (Tabela I).

Das 76 reações sorológicas também realizadas nos macacos infectados não tratados, 75 foram positivos (título acima de 1:8), revelando um percentual de 98,6% de positividade e em 3 macacos normais foram realizadas 28 reações sorológicas, sendo todas elas negativas (Tabela I).

Conforme pode-se observar (Tabela II), nos macacos tratados os xenos e os testes sorológicos foram todos positivos antes do tratamento.

No macaco n.º 6, tratado com A.634, os 27 xenos realizados foram negativos e dos 21 testes sorológicos, 18 permaneceram positivos durante o período de 36 meses após a terapêutica.

No macaco n.º 7, tratado com A.471, foram encontrados os percentuais de positividade de 81,8 e 81,2, respectivos aos xenodiagnósticos e testes sorológicos feitos no decorrer de 12 meses após o tratamento.

DISCUSSÃO

CHAGAS¹² já havia assinalado há muitos anos a presença de *Trypanosoma cruzi* em primatas. Outros Autores também estudaram o comportamento da doença de Chagas em macacos 4,5,20,21,22.

TORREALBA²⁹ e CARVALHEIRO & col.¹¹, encontraram macacos do gênero *Cebus*, naturalmente infectados por tripanossomos seme-

lhantes ao *T. cruzi*. SOUZA & col.²⁷ também encontraram neste gênero de macaco um flagelado sanguíneo, o qual foi classificado como *T. cruzi*. Posteriormente, TORRES & TAVARES³⁰, BOLOMO & col.⁸ e CHAIA & col.¹³ obtiveram sucesso na infecção experimental do macaco *Cebus* por diferentes cepas do *T. cruzi*, em laboratório.

Dando continuidade aos nossos estudos anteriores¹³, podemos observar que todos os macacos infectados, e já na fase crônica da doença de Chagas, quando submetidos a xenodiagnósticos e reações sorológicas, revelaram percentuais de positividade elevados (100%), o que não aconteceu com aqueles primatas não infectados (0,0%).

Entretanto, nos macacos na fase crônica da doença, tratados com um composto altamente eficaz (A.634), e com um outro de atividade parcial (A.471), já previamente estudados por nós em camundongos¹⁴, notamos que os resultados dos xenos foram adequadamente concordantes com as referidas atividades dos compostos. Assim, dos 27 xenos realizados durante o período de 36 meses após o tratamento com A.634, todos foram negativos, enquanto que no macaco tratado com o composto parcialmente ativo, de 22 xenos realizados, apenas 4 foram negativos (Tabela II).

Embora CANÇADO & col.¹⁰, defendam o fato de que, em humanos, as reações sorológicas devam-se negatizar ou cair a títulos mais baixos que os da fase anterior ao tratamento para que se possa afirmar a cura, em nosso experimento, no macaco tratado com o composto

A.634, considerado altamente eficaz, os títulos sorológicos observados até 36 meses após o tratamento não caíram e, no decorrer deste período, foram apenas esporadicamente negativos, voltando a positivar-se, apesar dos xenodiagnósticos continuarem sempre negativos.

No macaco tratado com o composto considerado parcialmente ativo e cujos xenos permaneceram positivos, os dados referentes à sorologia foram idênticos aos do macaco considerado por nós parasitologicamente curado. Aliás, esses dados referentes ao controle de cura são concordantes com as opiniões de diversos Autores que se dedicam à terapêutica da doença de Chagas em humano ^{6,7,15,25}.

Como até o momento o único método seguro para avaliação de quimioterápicos é o xenodiagnóstico e, existindo divergências sobre o valor da sorologia como controle de cura, achamos que o macaco *Cebus* venha a ser também o animal de escolha para estudar-se o valor das reações sorológicas após a terapêutica de infecções agudas ou crônicas da doença de Chagas.

Devido aos fatos anteriormente mencionados, somos de opinião que o macaco *Cebus*, facilmente encontrado em nosso meio, possa ser utilizado em laboratório para o estudo experimental de quimioterápicos destinados à cura da doença de Chagas na fase crônica.

SUMMARY

Experimental infection of monkeys *Cebus apella* sp with *Trypanosoma cruzi*

III — The value of xenodiagnosis and serodiagnosis in the chronic phase of the disease

A remarkable percentage of positiveness was obtained through xeno and serodiagnosis (direct agglutination) performed in *Cebus apella* sp monkeys infected with *Trypanosoma cruzi* strains Y and São Felipe, during the chronic phase of Chagas (1.5 years' infection). At the same time other non-infected monkeys were also submitted to the same tests and the results were negative. Two of the infected monkeys were treated with compounds of partial and total activity in mice, whose parasitological results in primates agreed with the effective-

ness of those compounds. The Authors discuss the performance of xeno and serodiagnosis as methods of infection evaluation as well as post-therapy control and propose the monkey as a potential model for the study of chemotherapies in the chronic phase of Chagas' disease.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. & SADIGURSKY, M. — Combined treatment with a nitrofuranic and a corticoid in experimental Chagas' disease in the dog. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20: 766-773, 1980.
2. ANDRADE, Z. A. & ANDRADE, S. G. — A patologia da doença de Chagas experimental no cão. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio)* 75: 77-95, 1980.
3. ANSELMINI, A.; PIFANO, F. C.; SUAREZ, A.; DOMINGUEZ, A.; VASQUES, A. D. & ANSELMINI, G. — Experimental Schizotrypanum cruzi myocarditis. Correlation between histopathologic and electrocardiographic findings in experimental Chagas' heart disease. *Am. Heart J.* 70: 638-656, 1965.
4. ARANTES, J. B. — Estudos parasitológicos I. Do comportamento do *Trypanosoma cruzi* no *Silenus rhesus*. *Mem. Inst. Butantan* 6: 223-235, 1931.
5. BAFORT, M. J.; KAGERUCA, P. V. & TIMPERMAN, G. — American trypanosomiasis — A new host. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 67: 435-438, 1973.
6. BARCLAY, C. A. — Evaluación de la sorologia y parasitemia en pacientes tratados con Benzonidazol. Segundo Congr. Argentino de Parasit., Buenos Aires, Nov. 1979.
7. BOAINAIN, E. — Tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. *Rev. Goiania Med.* 25: 1-60, 1979.
8. BOLOMO, N.; MILEI, J.; SEGUNA, E.; DEL PRADO, E.; GONZALEZ CAPPA, S.; CASSIO, P. M. & ANANA, R. M. — Infección chagásica experimental en un primate Sudamericano [*Cebus* sp]. *Medicina (Buenos Aires)* 37: 509, 1977.
9. BRENER, Z. — Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4: 389-396, 1962.
10. CANÇADO, J. R.; SALGADO, A. A.; MARRA, V. D.; ALVARES, J. M. & MACHADO, J. R. — Ensaio terapêutico clínico da doença de Chagas crônica com o nifurtimox em três esquemas de duração prolongada. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 17: 111-125, 1975.
11. CARVALHEIRO, J. R. & BARRETTO, M. P. — Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XIII: Infecção natural do macaco *Cebus apella* versus Elliot, 1910, por tripanossomo semelhante ao *T. cruzi*. *Rev. Brasil. Biol.* 26: 101-114, 1966.

GRANADO, N.; RASSY, M. R. N.; NOGAROTO, S. L.; CARVALHAL, S.; ALMEIDA, E. A. de & CHAIA, G. — Infecção experimental de macacos *Cebus apella* sp pelo *Trypanosoma cruzi*. III — Valor do xenodiagnóstico e da sorologia na fase crônica da doença. *Rev. Inst. Med. trop.* São Paulo 25:283-287, 1983.

12. CHAGAS, C. — Sobre a verificação do *Trypanosoma cruzi* em macacos do Pará (*Chrysothrix sciureus*). *Sci. Med.* 2: 75-76, 1924.
13. CHAIA, G.; ABREU, I. B.; CHIARI, L. & ARAUJO, S. — Infecção experimental de macacos *Cebus apella* sp pelo *Trypanosoma cruzi* (Cepa Y). I — Curva da parasitemia na fase aguda da Doença de Chagas. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 11: 82-85, 1977.
14. CHAIA, G.; NOGAROTO, S. L. & RASSY, M. R. N. — Atividade dos compostos A-634 e A-471 em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. (Relat. Int.) — *Inst. Pesq. J. & J. Doenças End.*, Sumaré, SP, 1978.
15. FERREIRA, H. O. — Ensaio terapêutico clínico com benzonidazol na doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop.* São Paulo 18: 357-364, 1976.
16. GOBLE, F. C. — Observations on experimental Chagas' disease in dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1: 189-204, 1952.
17. JOHNSON, C. M. — Cardiac changes in dogs experimentally infected with *T. cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18: 197-206, 1938.
18. LAURIA, L. P. & TANUS, R. — Infecção experimental em cães pelo *Trypanosoma cruzi*. XV Congr. Soc. Brasil. Med. Trop. Campinas, SP., Fev. 1979.
19. LOPES, E. R.; TAFURI, W. L.; CHAPADEIRO, E.; LAURIA, L. P.; MACEDO, V.; PRATA, A. R. & TANUS, R. — Doença de Chagas em cães — Estudo anátomo-patológico de animais naturalmente infectados. *Rev. Inst. Med. trop.* São Paulo 22: 135-143, 1980.
20. 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. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70: 247-251, 1976.
21. MAYER, M.; PIFANO, F. & MEDINA, R. — Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Rev. Soc. Est. Med.* 13: 134-186, 1946.
22. MILES, M. A.; PATTERSON, J. W.; MARSDEN, P. D. & MINTER, D. M. — A comparison of *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* in the xenodiagnostic of a chronic *T. cruzi* infection in a Rhesus monkey (*Macaca mullatta*). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 69: 377-382, 1975.
23. PEDREIRA, M. A. C. & BRENER, Z. — Acute Chagas' disease in dogs inoculated with y and CL strains of *T. cruzi*. VIII Reunião Caxambu, MG, Nov. 1981.
24. PELLEGRINO, J. — O ECG na fase crônica da doença de Chagas experimental no cão. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (Rio) 44: 615-647, 1946.
25. RASSI, A. — Tratamento específico da doença de Chagas com benzonidazol [Ro. 7-1051]. Primer Simp. Int. Enf. de Chagas. Soc. Chilena Parasit., Santiago Out. 1977.
26. SNIDER, T. G.; YAEGER, R. G. & DELLUCKY, J. — Myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* in a native Louisiana dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177: 247-249, 1980.
27. SOUZA, E. O.; ROSSAN, R. N. & BAERG, G. D. — The prevalence of trypanosomes and microfilariae in Panamanian monkeys. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 23: 862-868, 1974.
28. STORNI, P. D.; BOLSI, F. L. & YANOVSKY, J. F. — Reacción de aglutinación directa para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Utilización sistemática del 2-Mercaptoetanol para la eliminación de las aglutininas inespecificas. *Medicina* (Buenos Aires) 35: 67, 1975.
29. TORREALBA, J. F. — Investigaciones sobre enfermedad de Chagas en el Estado Guárico. *Gaz. Med. Caracas* 50: 3-4, 1943.
30. TORRES, C. M. & TAVARES, B. M. — Miocardite no macaco *Cebus* após inoculações repetidas com *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (Rio) 56: 85-119, 1958.
31. WILLIAMS, G. D.; ADAMS, L. G.; YAEGER, R. G.; MCGRATH, R. K.; READ, W. K. & BILDERBACK, W. R. — Naturally occurring trypanosomiasis (Chagas' disease) in dogs. *JAVMA* 171: 171-177, 1977. in LOPES, E. R.; TAFURI, W. L.; CHAPADEIRO, E.; PIRES, L. L.; MACEDO, V.; PRATA, A. R. & TANUS, R. — Doença de Chagas em cães. Estudo anátomo-patológico de animais naturalmente infectados. *Rev. Inst. Med. trop.* São Paulo 22: 135-143, 1980.

Recebido para publicação em 18/5/1982.