

***Trypanosoma cruzi*: PARASITISMO DEL TEJIDO CONECTIVO ADIPOSEO**

***Trypanosoma cruzi*: Parasitism in Adipose Connective Tissue**

Leidi Herrera¹, Antonio Morocoima², Cruz M. Aguilar³ y Servio Urdaneta-Morales¹

¹Laboratorio de Biología de *Trypanosoma* de Mamíferos, Instituto de Zoología Tropical, Universidad Central de Venezuela. Apartado postal 47462., Los Chaguaramos 1041-A, Caracas, Venezuela. E-mail: herreraledi@hotmail.com / vcug73@hotmail.com.

²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Oriente. Puerto La Cruz, Venezuela.

³Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CIET-Universidad de Carabobo). San Carlos, Cojedes, Venezuela.

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, causante de la enfermedad de Chagas, es un hemoflagelado ubicuo e intracelular obligatorio de mamíferos. Macrófagos y adipocitos han sido incriminados como blancos de la invasión temprana por este parásito; a pesar de ello, su histotropismo es estudiado habitualmente en la musculatura, órganos digestivos y estructuras nerviosas por presentar patología más frecuentemente. En este trabajo se investigó al tejido conectivo graso como un microambiente apropiado para *T. cruzi* en la fase aguda de la infección, inoculando vía subcutánea a ratones NMRI con aislados caracterizados por RAPD como Zimodeme 1 (Z1=*T. cruzi* I) obtenidos de *Panstrongylus geniculatus*; *Rhodnius prolixus*, *Didelphis marsupialis*; glándulas anales de estos marsupiales, *Rattus rattus* y humanos de zonas urbanas y rurales de Venezuela. Animales con parasitemias elevadas (10^5 tripomastigotes/mL de sangre) fueron sacrificados durante la fase aguda de la infección mediante sobrianestesia para retirarles fragmentos de tejido conectivo adiposo univacuolado anexo al esternón, que fueron trabajados histológicamente y teñidos con H-E. Parasitismo intracelular escaso a intenso (1-10/31-40 pseudoquistes en 50 campos de 400X, respectivamente) con la presencia de estadios amastigotes o tripomastigotes fue producido en macrófagos y adipocitos de ratones. Los resultados muestran que poblaciones de *T. cruzi* pueden colonizar frecuentemente al conectivo adiposo, independientemente del hospedador experimental y del área geográfica del cual se aislaron; por ello, el estudio de este tejido es recomendado en investigaciones sobre la caracterización de esta parasitosis. Se discuten estos resultados en relación con el

hallazgo de *T. cruzi* en hábitats particulares, como las glándulas anales de marsupiales ricas en lípidos, en las cuales su polimorfismo y metacicloogénesis son dependientes de niveles adecuados de material graso.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, tejido conectivo adiposo, histotropismo.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, an ubiquitous obligatory intracellular hemoflagellate, is responsible for Chagas's disease in mammals. Macrophages and adipocytes have been considered as to be early parasite invasion targets; even when historically their tissue behavior has usually been studied in muscles and digestive and nervous structures which are generally damaged. In this study connective adipose tissue was investigated as a adequate micro-environment for *T. cruzi*, during infection acute phase, by inoculating NMRI mice with isolates, which were characterized by RAPD such as Zimodeme 1 (Z1= *T. cruzi* I) and obtained from *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius prolixus*, *Didelphis marsupialis*, anal glands from these marsupials, *Rattus rattus* and humans from urban and rural areas of Venezuela. Animals with high parasite levels (1-10/31-40 pseudocysts/50 fields 400X) were sacrificed during the high infection level phase, with the presence of amastigotes or tripomastigotes which were produced in mice macrophages and adipocytes. The results show that *T. cruzi* populations can usually colonize fat tissues, regardless of the host or the geographic areas in which they were isolated. The study of this tissue is recommended in research on the characterization of this parasitosis. The results are discussed in relation to the findings of *T. cruzi* in special habitats, such as the fat rich marsupial

anal glands, since their polymorphism and metacyclogenesis are dependent on adequate levels of lipid materials.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, adipose connective tissue, histotropism.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi Chagas, 1909, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es transmitido mediante la deposición, sobre piel lesionada o membranas mucosas intactas de mamíferos, de heces u orina de sus vectores (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) que contienen tripomastigotes metacíclicos [32].

Aun cuando está establecida la extrema heterogeneidad natural [6, 9] y ubicuidad tisular de este protozoario [21], la mayoría de los estudios sobre su comportamiento en humanos y otros mamíferos se refiere a los tejidos musculares, gastrointestinales y nerviosos que son habitualmente invadidos [1, 3, 14, 18, 26, 27].

Las escasas investigaciones sobre las relaciones tisulares parásito-hospedador tempranas indican que *T. cruzi* utiliza, frecuentemente, al tejido adiposo para desarrollar ciclos intracelulares iniciales en animales infectados por vía subcutánea (s.c.) o intraperitoneal (i.p.) con tripomastigotes de sangre de mamíferos o de cultivos de células [4, 15, 28, 29]; sin embargo, los tipos de células del tejido conectivo graso que se comportan como blancos en la invasión y multiplicación del parásito no han sido claramente determinados [1, 2, 13, 14, 21, 24, 26].

Por todo ello, el objetivo de este trabajo fue investigar la presencia del parásito en células del tejido adiposo de ratones experimentalmente infectados con poblaciones de tripomastigotes metacíclicos fecales y glandulares obtenidos, respectivamente, de triatominos (chupos, vinchucas) y de marsupiales (rabipelados, zarigüeyas) naturalmente infectados, así como de chipos utilizados en xenodiagnósticos de mamíferos y de humanos provenientes de zonas urbanas, rurales y silvestres de diferentes áreas geográficas de Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

Se utilizaron poblaciones de metatripomastigotes de *T. cruzi* obtenidas de aislados de vectores, reservorios y humanos procedentes de diferentes áreas de Venezuela (TABLA I). Los animales y los humanos fueron examinados mediante xenodiagnósticos naturales (directos) y artificiales (indirectos) [23], respectivamente, con 15 *Rhodnius prolixus* sanos de III estadio criados en el insectario del Laboratorio de Biología de *Trypanosoma* de Mamíferos, Instituto de Zoología Tropical, Universidad Central de Venezuela.

Los aislados fueron previamente caracterizados molecularmente como Zimodeme 1 (Z1, equivalente a *T. cruzi* I [5], asociado generalmente al ciclo de transmisión silvestre) mediante la técnica de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) usando el primer de 3'GAACGGTG5' cuando se compararon con los perfiles de RAPD de aislados de referencia [18, 19, 27].

TABLA I
AISLADOS DE *Trypanosoma cruzi* OBTENIDOS DE VECTORES, RESERVORIOS Y HUMANOS

Aislado	Hospedador	Hábitat	Comunidad	Estado
TGEN/VE/1995/VP27	<i>P. geniculatus</i>	Urbano	La Vega	Caracas, D. F.
TGEN/VE/1995/VP28	<i>P. geniculatus</i>	Urbano	Petare	Caracas, D. F.
TPRX/VE/1996/VP30	<i>R. prolixus</i>	Rural	Campo Alegre	Cojedes
TPRX/VE/2000/V4	<i>R. prolixus</i>	Rural	Cambural	Anzoátegui
MDID/VE/1992/IN16	<i>D. marsupialis</i>	Urbano	Colinas de Bello Monte	Caracas, D. F.
MDID/VE/1995/CO79	<i>D. marsupialis</i>	Urbano	Parque del Este	Caracas, D. F.
MDID/VE/1995/CO62	<i>D. marsupialis</i>	Urbano	El Marqués	Caracas, D. F.
MDID/VE/2000/AM5	<i>D. marsupialis</i>	Rural	Cambural	Anzoátegui
MDID/VE/1994/CO57	<i>D. marsupialis</i>	Urbano	Alta Florida	Caracas, D. F.
MRAT/VE/1993/CO22	<i>R. rattus</i>	Urbano	Colinas de Bello Monte	Caracas, D. F.
MHOM/VE/1970/EP	Humano	Urbano	Tinaquillo	Cojedes
MHOM/VE/2000/PO	Humano	Rural	Paraminal	Anzoátegui

Infecciones experimentales

Metacíclicos de *T. cruzi* obtenidos por disección, en solución salina estéril (0,85%), del intestino de los triatominos infectados naturalmente y de los usados en los xenodiagnósticos así como de las glándulas anales de los marsupiales, cosechados de acuerdo con Deane y col. [12], sirvieron para infectar por vía s. c. (150-200 metacíclicos/g) a lotes de cinco ratones albinos NMRI exógamos de 15 g promedio (n=60). Sangre de la vena de la cola de los animales fue examinada con cámara Neubauer, tres veces/semana, para detectar y cuantificar las parasitemias; la mortalidad de los animales fue anotada diariamente.

Por cuanto la proliferación intracelular de *T. cruzi* se realiza durante la parasitosis chagásica aguda en infecciones naturales o experimentales [1, 3, 16] un animal, de cada lote, fue seleccionado al azar entre los que presentaron parasitemias elevadas para realizar estudios histológicos. El animal fue sacrificado por sobreenestesia ("Ketaset". Ketamine HCl, 100 mg/mL, Fort Dodge. E. U. A.) y fragmentos de corazón así como de músculo esquelético y de tejido conectivo adiposo univacuolar (blanco) anexos al esternón fueron fijados inmediatamente en Millonig, embebidos en parafina, cortados seriadamente en secciones de tres micrómetros de espesor, teñidos con hematoxilina-eosina y examinados en un doble ciego (1000X) para determinar la invasión tisular por *T. cruzi*. Los tipos de células infectadas del tejido adiposo fueron determinados morfológicamente y los parásitos fotografiados con un microscopio Nikon acoplado a una cámara Microflex HPX-35 cargada con película Ilford Pan F. El histotropismo fue estimado como: —, +, ++, +++, +++++ = parasitismo intrace-

lular ausente, escaso (1-10 nidos de parásitos/50 campos de 400X), moderado (11-20 nidos/50 campos), abundante (21-30 nidos/50 campos) e intenso (31-40 nidos/50 campos), respectivamente.

Análisis estadístico

Los valores medios de período pre-patente, valores máximos de parasitemia y tiempo de mortalidad de los ratones experimentalmente infectados, fueron comparados simultáneamente a través de un análisis de varianza de una sola vía para determinar diferencias entre cada uno de los aislados estudiados; el análisis estadístico fue realizado mediante el programa Statgraphics, versión 2.0.

RESULTADOS

La cinética de la infección experimental por los aislados de *T. cruzi* en el modelo murino utilizado es descrita en la TABLA II.

Los aislados de *T. cruzi* fueron letales para el 100% de los ratones infectados. El análisis de varianza reveló que no se observaron diferencias significativas entre los aislados estudiados cuando se analizaron simultáneamente período pre-patente, tiempo de sobrevivencia de los animales y valores medios de máxima parasitemia ($F = 0,25 \geq P; P \leq 0,05$).

El histotropismo producido por los aislados se detalla en la TABLA III.

TABLA II
CINÉTICA DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE RATONES NMRI CON AISLADOS DE *Trypanosoma cruzi*

Aislado	Período pre-patente (días)		Máximo de Parasitemia ($\times 10^5$ trip/mL/día PI)		Mortalidad (días)	
	M	DE	M	DE	M	DE
TGEN/VE/1995/VP27	10	0,2	1/29	0,3	29	1,2
TGEN/VE/1995/VP28	18	0,7	1/28	0,7	31	1,2
TPRX/VE/1996/VP30	20	0,7	2/32	0,5	45	1,3
TPRX/VE/2000/V4	11	1,2	1/15	0,7	18	0,7
MDID/VE/1992/IN16	10	0,3	10/16	0,2	22	1,2
MDID/VE/1995/CO79	17	1,2	2/18	0,4	30	1,3
MDID/VE/1995/CO62	8	0,4	1/17	0,7	17	0,5
MDID/VE/2000/AM5	8	0,5	1/19	0,1	26	1,2
MDID/VE/1994/CO57	15	1,2	6/22	0,3	22	0,7
MRAT/VE/1993/CO22	14	0,7	1/20	0,3	20	0,5
MHOM/VE/1970/EP	11	1	9/11	1,2	22	0,7
MHOM/VE/2000/PO	15	1,2	2/33	0,3	36	1,3

M: valores medios. DE: desviación estándar. Trip: tripomastigotes. PI: post inoculación.

TABLA III
HISTOTROPISMO DE AISLADOS DE *Trypanosoma cruzi* EN RATONES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

Aislado	Tejido cardíaco	Tejido esquelético		Tejido Adiposo		
TGEN/VE/1995/VP27	+	+++	A	--	M	++
TGEN/VE/1995/VP28	+	+++	A	--	M	+
TPRX/VE/1996/VP30	+++	+	A	--	M	+
TPRX/VE/2000/V4	+	++++	A	+++	M	++
MDID/VE/1992/IN16	+++	++++	A	+	M	++
MDID/VE/1995/CO79	+++	++++	A	+	M	++
MDID/VE/1995/CO62	+	++++	A	++	M	++++
MDID/VE/2000/AM5	+	++++	A	+	M	++++
MDID/VE/1994/CO57	+	++++	A	+	M	--
MRAT/VE/1993/CO22	+	+++	A	+	M	+++
MHOM/VE/1970/EP	+++	+++	A	++	M	+++
MHOM/VE/2000/PO	+++	++++	A	--	M	++

A: Adipocitos. M: macrófagos.

Todos los aislados, independientemente del hospedador y del área geográfica del cual se obtuvieron, invadieron miocitos esqueléticos y cardíacos así como adipocitos y macrófagos del conectivo graso.

En el tejido conectivo, pseudoquistes con parásitos en forma de amastigotes, tripomastigotes o estadios en desarrollo a epimastigotes, fueron encontrados en el citoplasma periférico típico de los adipocitos univacuolados (maduros) o en las áreas de citoplasma intracelular de preadipocitos, así como también en macrófagos y en la substancia intercelular del conectivo, en la cual los parásitos fueron encontrados también libres (FIG. 1). Se observó la presencia de macrófagos con numerosos amastigotes y tripomastigotes, inmediatamente anexas a adipocitos sin parásitos.

Las áreas perivasculares del tejido adiposo mostraron, generalmente, la mayor cantidad de células infectadas con los números más elevados de pseudoquistes y de parásitos. Invasión intracelular intensa estuvo asociada a infiltrado inflamatorio linfocítico del mismo nivel, el cual rodeó a los nidos de parásitos en adipocitos y macrófagos. El grado del parasitismo del tejido graso se correlacionó frecuentemente con el del músculo esquelético anexo (TABLA III).

DISCUSIÓN

T. cruzi es una especie que invade obligatoriamente a células de hospedadores mamíferos en las cuales se diferencia a estadios amastigotes proliferativos y tripomastigotes. Estos últimos, liberados de las células pasan al torrente sanguí-

neo pudiendo ser ingeridos por vectores hematófagos estrictos en los cuales desarrollan un polimorfismo que culmina con la formación de metatripomastigotes infectantes para los mamíferos, reiniciándose el ciclo mediante contaminación fecal [16]. A partir del sitio inicial de deposición de heces-orina por vectores infectados, los metacíclicos son diseminados vía sistema sanguíneo o linfático [32] por lo cual *T. cruzi* puede parasitar prácticamente a todos los tejidos y órganos del animal [21].

En el período de colonización inicial del protozoario, el tejido graso es preferentemente invadido [4, 21, 28, 33]; en el presente material, todos los aislados utilizados, independientemente del hospedador y del área geográfica del cual se obtuvieron, invadieron al tejido conectivo graso en la fase aguda de la infección; sin embargo, algunos aislados no parasitaron a las células grasas.

Los resultados del presente trabajo señalan al adipocito como un hábitat favorable a la multiplicación y diferenciación de *T. cruzi* en el mamífero. En este contexto, es importante resaltar la ocurrencia del ciclo extracelular que desarrolla este parásito en las glándulas anales de varias especies de marsupiales, en las cuales se producen los estadios que son propios del vector [20]. Las células epiteliales y el lumen de estas glándulas son ricos en lípidos [20], entre los cuales se encuentran triglicéridos, ácidos grasos, colesterol y fosfolípidos [7]. Estos materiales constituyen los glóbulos típicos de los adipocitos de los mamíferos, por lo cual el tejido graso es considerado metabólicamente activo y responsable de la síntesis, acumulación y movilización de energía [31].

Según Deane y col. [12], los flagelados luminales de *T. cruzi* de las glándulas anales de los marsupiales presentan un

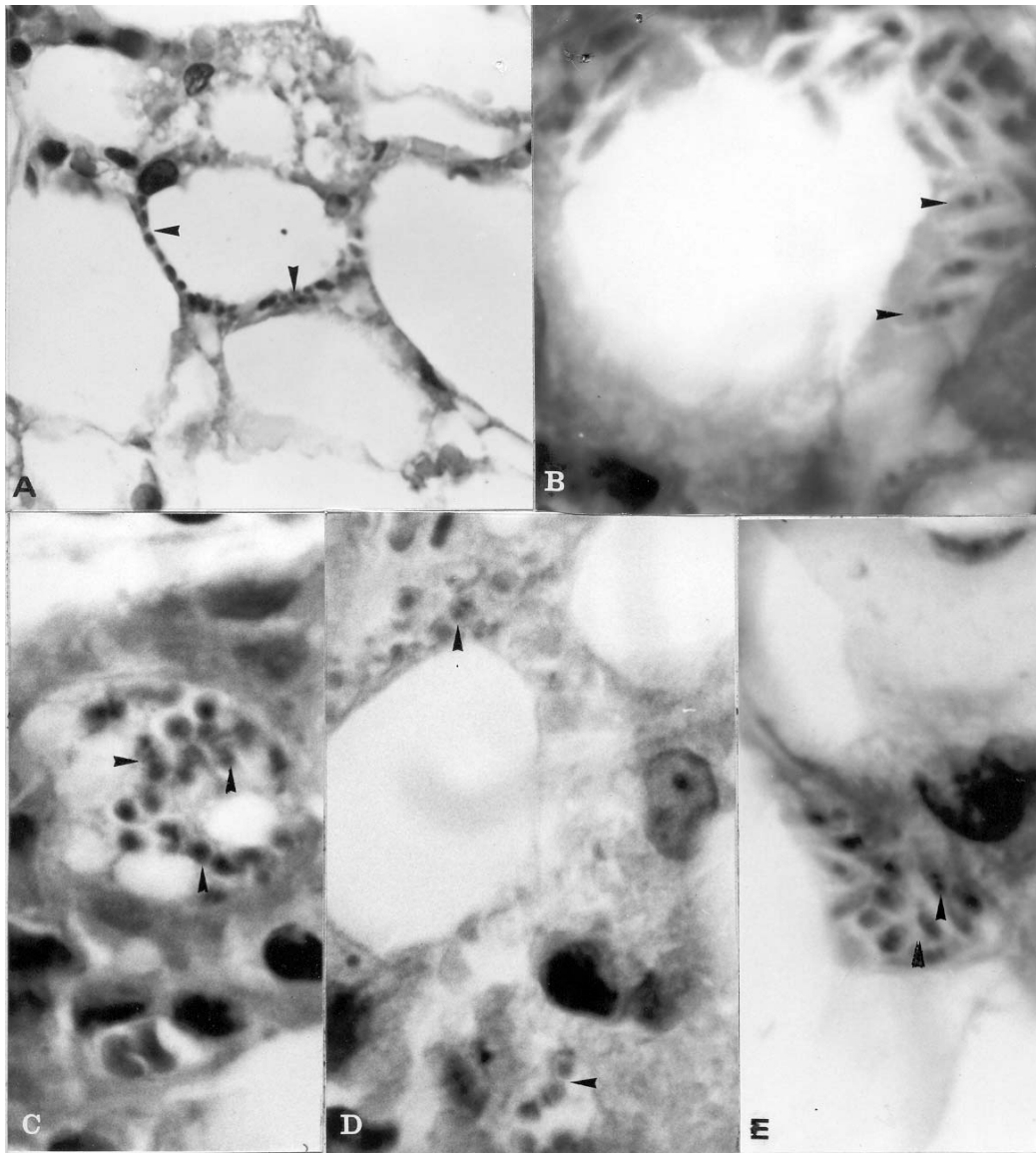


FIGURA 1. AMASTIGOTES O ESTADIOS INTERMEDIOS (FLECHAS) DE *Trypanosoma cruzi* EN:
A. CITOPLASMA PERIFÉRICO DE ADIPOCITO (AISLADO MDID/VE/2000/AM5); B. IDEM (AISLADO TPRX/VE/2000/V4; 1400X);
C. CITOPLASMA DE ADIPOCITO INMADURO (PREADIPOCITO) (AISLADO MHOM/VE/1970/EP; 1400X);
D. SUBSTANCIA INTERCELULAR DE TEJIDO CONECTIVO ADIPOSITO (AISLADO TPRX/VE/2000/V4; 1400X);
E. MACRÓFAGO PARASITADO SITUADO ENTRE ADIPOCITOS NO INFECTADOS (AISLADO MDID/VE/1995/CO62; 1400X).
(HEMATOXILINA-EOSINA).

número elevado de gotas de grasa en su citoplasma; por otra parte, la proliferación de los epimastigotes se realiza en un área cercana al epitelio glandular en la cual abunda el ácido hialurónico, en tanto que su metaciclogénesis se produce en áreas centrales de este microhábitat, rico en lípidos, en donde abundan metatripomastigotes [7], por lo cual se puede inferir que la diferenciación del parásito en las glándulas anales depende, entre otros factores, de la presencia de determinados niveles de material graso y evidencia, así mismo, la preferencia de *T. cruzi* por habitats ricos en lípidos.

Los Trypanosomatidae, incluyendo *T. cruzi*, acumulan en reservosomas citoplasmáticos, grandes cantidades de co-

lesterol esterificado y ergosterol, los cuales son consumidos durante su metaciclogénesis [10].

En general, durante el curso de la enfermedad de Chagas el parásito invade, en grados diferentes, a tejidos y órganos del hospedador; por ello, Andrade y Andrade [3] señalan al histotropismo de las cepas de *T. cruzi* como un parámetro importante en su caracterización, agrupándolas como mio, macrofago y neurotrópicas. En la presente investigación, el tropismo hacia el conectivo graso fue un carácter común en todos los aislados utilizados, lo cual indicaría que este microhábitat le proporciona al parásito compuestos necesarios en sus estrategias para desarrollar su ciclo intracelular [34]. Por ello, son

necesarios estudios que determinen posibles correlaciones entre el parasitismo de este tejido y las subpoblaciones de *T. cruzi* en las diferentes fases de la molestia de Chagas.

Los mecanismos que expliquen la marcada preferencia de *T. cruzi* a invadir diferentes células hospedadoras son controversiales [25]). De acuerdo a lo conocido hasta ahora, el tropismo temprano del parásito hacia células grasas en la infección chagásica es un comportamiento a ser clarificado. Charriere y col. [8] mostraron que preadipocitos cambiaron rápidamente su fenotipo, mediante contacto con macrófagos peritoneales de ratón, adquiriendo una elevada capacidad fagocítica por lo cual podrían ser una fuente eficiente de poblaciones de macrófagos. Por ello se piensa, que la plasticidad de estas células grasas podría explicar, en parte, la rápida parasitosis del conectivo graso que se realiza en la etapa inicial de la infección por *T. cruzi* y explicaría, así mismo, el encuentro de números elevados de macrófagos parasitados adyacentes, en algunos casos, a adipocitos sanos.

El eclecticismo de este parásito determina su afinidad tisular de acuerdo con el estado inmune de su hospedador [17, 30], lo cual sugirió a Andrade y Silva [4] la posibilidad de que la infección del tejido adiposo podría ser dependiente de la virulencia incrementada del protozoario o de la susceptibilidad del hospedador. Por ello, se debe enfatizar que se utilizaron animales experimentales inmunocompetentes infectados con aislados de *T. cruzi*, obtenidos de vectores y de mamíferos naturalmente infectados o mantenidos con un promedio de diez subpasajes ratón-triatomino-ratón, lo cual disminuye posibles variaciones en la virulencia del parásito así como la selección de subpoblaciones y, con ello, cambios en la relación *T. cruzi*-hospedador mamífero [11, 29].

Las diferencias en la invasión tisular producida por los aislados estudiados, serían consecuencia de la conocida heterogeneidad genética de *T. cruzi* expresada en las múltiples poblaciones multiclonales del parásito que se encuentran en las diferentes cepas que se aíslan de vectores, reservorios y humanos [22].

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados del trabajo, todas las subpoblaciones de *T. cruzi* utilizadas, mostraron tempranamente un tropismo común hacia el tejido graso, independientemente del hospedador y del área geográfica de las cuales se aislaron. Este hecho podría indicar el carácter apropiado de este tejido como blanco del parásito, al facilitarle el desarrollo de los mecanismos que le permiten infectar y proliferar en el mamífero.

Estudios sobre el comportamiento de este tejido en las otras fases de la infección, son necesarios.

Se puede deducir que el uso del conectivo graso, es recomendable en investigaciones que persigan un mejor conocimiento de este complicado protozoario y de la parasitosis que causa.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (Proyecto No. 03 31 4729 03).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Reconcavo baiano. **Rev. Pat. Trop.** 3: 65-121. 1974.
- [2] ANDRADE, S. G.; ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; MAGALHAES, J.; NETTO, M. B. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Trop. Med. Parasit.** 79: 397-407. 1985.
- [3] ANDRADE, Z.; ANDRADE, S. G. Patologia. En: Brener, Z.; Andrade, Z. (Eds.). **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Guanabara Koogan. Brasil: 199-248 pp. 1979.
- [4] ANDRADE, Z.; SILVA, H. R. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 90: 521-522. 1995.
- [5] AÑEZ, N.; CRISANTE, G.; SILVA, F.; ROJAS, A.; CARRASCO, H.; UMEZAWA, E.; STOLF, A.; RAMIREZ, J.; TEIXEIRA, M. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. **Trop. Med. Internat. Health.** 9: 1319-1326. 2004.
- [6] BRIONES, R.; SOUTO, R.; STOLF, B.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Mol. Bioch. Parasit.** 104: 219-232. 1999.
- [7] CARREIRA, J. C.; JANSEN, A. M.; MEIRELLES, M.; COSTA, F.; SILVA, E. F.; LENZI, H. *Trypanosoma cruzi* in the scent glands of *Didelphis marsupialis*: the kinetics of colonization. **Exp. Parasit.** 97: 129-140. 2001.
- [8] CHARRIERE, G.; COUSIN, B.; ARNAUD, E.; ANDRE, M.; BACOU, F.; PENICAUD, L. Preadipocyte conversion to macrophage. **J. Biol. Chem.** 278: 9850-9855. 2003.
- [9] COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A.; FERNÁNDES, O.; VALENTE, S.; MILES, M. Emerging Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Trends. Parasit.** 18: 171-176. 2002.
- [10] CUNHA-e-SILVA, N. L.; ATELLA, G.; PORTO-CARREIRO, I.; MORGADO-DIAZ, J.; PEREIRA, M.; DE SOUZA, W. Isolation and characterization of a reservoir fraction from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS. Microbiol. Lett.** 214: 7-12. 2002.

- [11] DEANE, M. P.; JANSEN, A. M.; MANGIA, R.; GONCALVES, A.; MOREL, C. M. Are our laboratory "strains" representative samples of *Trypanosoma cruzi* populations that circulate in nature?. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 79 (Supp.): 19-24. 1984a.
- [12] DEANE, M. P.; JANSEN, A. M.; LENZI, H. *Trypanosoma cruzi*: Vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 79: 513-515. 1984b.
- [13] DE DIEGO, J. A.; PALAU, M.; GAMILLO, C.; PENIN, P. Relationships between histopathological findings and phylogenetic divergence in *Trypanosoma cruzi*. **Trop. Med. Internat. Health** 3: 222-233. 1998.
- [14] DEUTSCHLANDER, N.; VOLLERTUN, R.; HUNGERER, K. Histopathology of experimental Chagas disease in NMRI mice. **Tropenmed. Parasit.** 29: 323-329. 1978.
- [15] DIAS, E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 28: 1-110. 1934.
- [16] DUSANIC, D. *Trypanosoma cruzi*. En: Kreier, J.; Baker, J. (Eds.). **Parasitic protozoa**. Academic Press. E. U.: 137-194 pp. 1991.
- [17] GONCALVES DA COSTA, S.; LAGRANGE, P.; HURTREL, B.; KERR, I.; ALENCAR, A. Role of T lymphocytes in the resistance and immunology of experimental Chagas' disease. I. Histopathological studies. **Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)** 135C: 317-332. 1984.
- [18] HERRERA, L. Comportamiento de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de vectores y reservorios, capturados en parques y asentamientos humanos del valle de Caracas (Venezuela). Universidad Central de Venezuela. (Tesis de Grado). 95 pp. 2001.
- [19] HERRERA, L.; XAVIER, S. C.; VIEGAS, C.; MARTINEZ, C.; COTIAS, P.; CARRASCO, H.; URDANETA-MORALES, S.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* in a caviomorph rodent: parasitological and pathological features of the experimental infection of *Trichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). **Exp. Parasit.** 107: 78-88. 2004.
- [20] LENZI, H.; JANSEN, A. M.; DEANE, M. P. The recent discovery of what might be a primordial escape mechanism for *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 79 (Supp. I): 13-18. 1984.
- [21] LENZI, H.; OLIVEIRA, D.; LIMA, M.; GATTASS, C. *Trypanosoma cruzi*: Paninfectivity of CL strain during murine acute infection. **Exp. Parasit.** 84: 16-27. 1996.
- [22] MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. **Exp. Rev. Mol. Med.** 4: 100-106. 2002.
- [23] MAECKELT, G. A modified procedure of xenodiagnosis for Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 13: 11-15. 1964.
- [24] MARSDEN, P.; HAGSTROM, W. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in beagle puppies. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 62: 816-824. 1968.
- [25] MEIRELLES, M.; PEREIRA, M.; SINGER, M.; SOEIRO, M.; GARZONI, L.; SILVA, D.; BARBOSA, H.; ARAUJO-JORGE, T. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocytes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 94: 149-152. 1999.
- [26] MELO, R.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J. Parasit.** 64: 175-182. 1978.
- [27] MOROCOIMA, A. Caracterización parasitológica y molecular de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos del estado Anzoátegui. Universidad Central de Venezuela. (Tesis de Grado). 114 pp. 2002.
- [28] PIFANO, F.; DOMÍNGUEZ, A.; ROMERO, J. Morfogénesis de las lesiones tempranas producidas por *Schizotrypanum cruzi* en condiciones experimentales y su correlación con la infección humana. **Arch. Venez. Med. Trop. Parasit Med.** V: 95-121. 1965.
- [29] POSTAN, M.; DVORAK, J.; MCDANIEL, J. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 32: 497-506. 1983.
- [30] ROCHA, A.; MENESES, A.; SILVA, A.; FERREIRA, M.; NISHIOKA, A.; BURGARELLI, M.; ALMEIDA, E.; TURCAZO, G.; METZE, K.; LOPES, E. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 50: 261-268. 1994.
- [31] RHODIN, J. **Histology**. Oxford Univ. E. U. A., 803 pp. 1977.
- [32] SCHUSTER, J.; SCHAUB, G. *Trypanosoma cruzi*: skin-penetration kinetics of vector-derived metacyclic trypomastigotes. **Int. J. Parasit.** 30: 1475-1479. 2000.
- [33] SHOEMAKER, J.; HOFFMAN, R.; HOFFMAN, D. *Trypanosoma cruzi*: preference for brown adipose tissue in mice by the Tulahuen strain. **Exp. Parasit.** 27: 403-407. 1970.
- [34] WAINSELBAUM, M.; ISOLA, E.; WILKOWSKY, S.; CANNATA, J.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. Lysosomal phospholipase A in *Trypanosoma cruzi*: an enzyme with possible role in the pathogenesis of Chagas' disease. **Bioch. J.** 355: 765-770. 2001.