

Dilatación del tracto digestivo de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.

Brizeida Guillén-Pernía¹, Ana Lugo-Yarbuh² y Elio Moreno².

¹Cátedra de Histología, Facultad de Medicina e ²Investigaciones Parasitológicas "José Francisco Torrealba" Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
Correo electrónico: lana@ciens.ula.ve.

Palabras clave: Estudio radiológico, tracto digestivo, infección chagásica crónica.

Resumen. En este trabajo, analizamos las alteraciones del tracto digestivo (TD) de ratones con infección chagásica crónica, producida por *Trypanosoma cruzi* de diferente origen. El examen radiológico del TD de 18 ratones infectados con *T. cruzi* y de 6 ratones controles no infectados, fue analizado después de la ingestión de una solución acuosa de Sulfato de Bario durante 6 horas. A los 120 días post-infección (pi), las radiografías del TD de los 5 ratones del grupo 1A infectados con tripanosomas del aislado DmI provenientes de *Didelphis marsupialis*, y 4 ratones del grupo 2A infectados con el aislado EP de un paciente con enfermedad de Chagas aguda, mostraron dilatación del estómago y del colon (C). A los 180 días pi las radiografías del TD de los 5 ratones del grupo 1B infectados con el aislado DmI y de los 4 ratones del grupo 2B infectados con el aislado EP mostraron una mayor dilatación del C. El análisis histológico del TD de todos los ratones infectados, reveló apreciable alteración en las capas musculares intestinales, tales como adelgazamiento de las capas muscular y mucosa, la pérdida de los pliegues y de los plexos mioentéricos. Basados en estos resultados podemos concluir que dos poblaciones de *T. cruzi* produjeron severas alteraciones digestivas en el modelo murino experimental utilizado y por otro lado, es posible que tales alteraciones pudieran presentarse en los órganos del sistema digestivo de casos humanos, especialmente en aquellos que viven en las diferentes áreas endémicas, donde tales alteraciones no han sido reportadas.

Digestive tract dilatation of mice infected with *Trypanosoma cruzi*.

Invest Clin 2001; 42(3): 195-209.

Key words: X-ray study, digestive tract, chronic chagasic infection.

Abstract. This paper will analyze alterations in the digestive tract (DT) of mice with chronic Chagas' disease infection produced by *Trypanosoma cruzi* from different sources. X-rays of the DT of 18 mice infected with *T. cruzi* and 6 control mice were compared after the ingestion of a barium sulfate solution over a period of 6 hours. 120 days post-infection (pi) the X-rays of the DT of the 5 mice in group 1A infected with trypanosomes DMI isolated from the opossum *Didelphis marsupialis*, and 4 mice in group 2A infected with the isolate EP taken from a patient with acute Chagas' disease, showed swelling of the stomach and the colon (C). 180 days pi, the X-rays of the DT of the 5 mice of group 1B infected with isolated DMI and the 4 mice in group 2B infected with isolate EP, showed an even greater swelling of the C. Histological examination of the DT of all infected mice showed extensive changes of the intestinal muscle layer, such as the diminution of the muscular and mucous layers and the loss of colonic folds and myoenteric plexus. These results suggest that *T. cruzi* populations caused severe alterations in the digestive system of the mice used in the experiment, and that the same alterations could occur in the digestive organs of humans, especially those living in areas where Chagas' disease is endemic, but where these abnormalities have not yet been reported.

Recibido: 26-01-2001. Aceptado: 31-07-2001.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una parasitosis ampliamente distribuida en regiones del Sur y Centro América, donde su agente etiológico, *Trypanosoma cruzi* infecta a sectores poblacionales rurales, suburbanos y urbanos (1). En modelos experimentales y en el hombre, *T. cruzi* muestra una evolución cronológica la cual se inicia con la aparición de parasitemias patentes, alteración inicial del sistema fagocítico mononuclear e in-

vasión a los tejidos cardíaco, digestivo y muscular esquelético (2, 3, 4).

En ciertas áreas geográficas, el cuadro clínico producido por diferentes cepas de *T. cruzi* durante la enfermedad de Chagas, se presenta con predominio de manifestaciones cardíacas y digestivas. En este sentido, clínicamente se han relacionado estas áreas con la prevalencia de diversas afecciones digestivas, estimándose que las lesiones del tracto digestivo son más frecuentes en áreas endémicas de Sur América con excepción de Venezuela y poco

frecuentes o no existen en Centro América (5, 6).

Algunas observaciones han asociado las dilataciones del tracto digestivo con la presencia de una cardiopatía chagásica (7, 8). Otros autores han correlacionado la formación de estas megadilataciones con el grado de virulencia y patogenicidad de las distintas cepas de *T. cruzi*, tanto en los casos chagásicos agudos como en los modelos experimentales (9). Investigaciones más recientes las han relacionado con las alteraciones del sistema neuroendocrino debida a su rol en la regulación de la función intestinal y como complejo migratorio motor a nivel de los plexos intramurales o mioentéricos del tracto digestivo (10, 11, 12).

Koberle (13) sugirió que el mecanismo patogénico que produce la destrucción de las células nerviosas cardíacas y las del sistema digestivo, ocurre durante la evolución de la parasitemia y, en consecuencia, determinaría el curso de la infección chagásica crónica, dependiendo del patrón genético del hospedador. Estas observaciones han conducido al establecimiento de posibles correlaciones entre el comportamiento de distintas cepas de parásitos de diferentes procedencias geográficas y las implicaciones clínicas y epidemiológicas de la enfermedad de Chagas.

En el presente estudio se evaluó, mediante exámenes radiológicos e histopatológicos, las alteraciones del tracto digestivo de ratones crónicamente infectados experimentalmente con dos aislados de *T. cruzi*,

procedentes de dos áreas endémicas para la enfermedad de Chagas en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados de *T. cruzi*

En este estudio se utilizaron dos aislados de *T. cruzi*: 1) M/HOM/VE/67 EP-67, obtenido de un caso agudo chagásico procedente del Estado Carabobo y 2) M/DID/VE/84 DmI-84, aislado de un *Didelphis marsupialis* capturado en el caserío Carmona del Estado Trujillo, ambos de Venezuela. Los tripanosomas contenidos en la sangre de los dos hospedadores fueron caracterizados mediante hemocultivo en el medio de cultivo difásico NNN; por inoculación en ratones machos NMRI por la vía intraperitoneal; por xenodiagnóstico artificial en ninfas de *Rhodnius prolixus* de IV estadio de desarrollo y por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (14). Los flagelados mantenidos en el medio de cultivo NNN fueron utilizados para la infección experimental de los ratones.

Animales experimentales

Se utilizaron ratones blancos cepa NMRI machos de 18 g de peso provenientes del Bioterio de cría de la Universidad de los Andes (BIOULA), alimentados con Ratarina (Protinal) y agua *ad libitum*.

Infección experimental

Dos grupos de 15 ratones cada uno fueron inoculados por vía intradérmica (ID) en la región abdominal con aproximadamente 50.000 trip-

mastigotos de los aislados EP y DmI, con 20 días de evolución en el medio de cultivo NNN. Para tal fin, los cultivos fueron lavados tres veces con Buffer Fosfato Salino (PBS) a pH 7.2 por centrifugación a 2000 rpm durante 15 min y separados a través de una columna de DEAE-Celulosa calibrada para el aislamiento de los tripanosomas metacíclicos, siguiendo las recomendaciones de Moreno y col. (15). En la suspensión final, los parásitos fueron cuantificados según el método de Brener (16) para obtener un inóculo de 5×10^4 tripanosomas/0,1 mL de la suspensión.

Detección de la parasitemia

A partir de los 5 días pi todos los ratones inoculados fueron evaluados diariamente, a fin de detectar parasitemias patentes en muestras de 5 μ L de sangre obtenida de la cola de cada raton (16). Los ratones que sobrevivieron a la fase aguda de la infección, fueron separados en 4 subgrupos para realizar los estudios radiológicos e histológicos del tracto digestivo en diferentes momentos durante dos etapas de la infección crónica. Así, diez ratones infectados con el aislado DmI fueron separados en dos subgrupos de 5 ratones cada uno (grupos 1A y 1B). Igualmente, ocho ratones infectados con el aislado EP fueron separados en dos subgrupos de 4 ratones cada uno (grupos 2A y 2B).

Procedimiento radiológico

Los ratones de los grupos 1A y 2A con 120 días de infectados, fueron seleccionados para el primer es-

tudio radiológico del tracto digestivo. Estos animales fueron sometidos a una ingesta de solución de Bario como medio de contraste (9). Para tal fin, 20 g de Sulfato de Bario fueron disueltos en 50 ml de agua, esta solución fue colocada en los frascos bebedero en las jaulas de los ratones durante 6 horas. Estos animales fueron mantenidos en el bioterio experimental alimentados con Ratarina, a una temperatura ambiente de 23°C y humedad relativa de 80%. Al cabo de este tiempo los animales fueron anestesiados con eter-dietílico por 3 minutos, tiempo suficiente para tomar las radiografías, colocando cada animal en posición anterior ventral o lateral sobre un equipo Phillips de rayos-X, a una distancia focal de 1 metro, usando 2,5 mA/seg y 46 Kv. Una serie de radiografías fueron tomadas a los animales utilizando placas radiográficas 10x10. Los ratones de los grupos 1B y 2B con 180 días de infectados, fueron utilizados para hacer el segundo estudio radiológico del tracto gastrointestinal. Estos animales infectados, así como un grupo de 6 ratones sanos controles, fueron dosificados con el medio de contraste y preparados para las exposiciones radiográficas en forma similar a como se describió anteriormente.

Preparación de las secciones histológicas

Una vez tomadas las radiografías, cada grupo animal fue sobre-anestesiado con cloroformo, y seguidamente sacrificados; los fragmentos de esófago, estómago, intestino

delgado e intestino grueso fueron separados para el estudio histológico. Las muestras de estos tejidos fueron fijadas en formalina neutra al 10% durante 24 a 48 horas, deshidratadas por pases sucesivos en alcohol isopropílico, incluidas en paraplast a 56°C y cortados a 7 μ en un microtomo American Optical Spencer. Las secciones de tejido se colorearon por el método de Hematoxilina y Eosina y fueron montadas con MarTex para la observación microscópica.

RESULTADOS

Parasitemia

El examen de la sangre caudal de los ratones infectados con los tripanosomas del aislado DmI, reveló parasitemias patentes entre 5 y 40 días pi, en niveles que oscilaron entre 18 y 120 trips/mm³, mientras que en los ratones que se infectaron con el aislado EP, los niveles de parasitemia variaron entre 22 y 235 trips/mm³ a los 10 y 40 días pi, respectivamente. Durante este período de la infección aguda, los animales infectados con los aislados de *T. cruzi*, desarrollaron aumento del volumen abdominal y alteración del tránsito intestinal. Entre los 20 y 40 días pi, murieron 5 (33,3%) de los infectados con DmI y 7 (46,6%) de los ratones infectados con el aislado EP. La autopsia de estos animales reveló hepatoesplenomegalia, abundante líquido en la cavidad peritoneal con inflamación del abdomen, dilatación de la vejiga urinaria con retención de orina y predominancia

de parasitismo en los tejidos cardíaco, digestivo y muscular esquelético, evidenciados en las preparaciones histológicas de estos tejidos coloreados con HE.

Estudio radiológico

El estudio de las radiografías del tracto digestivo de los 5 ratones con 120 días de infectados con el aislado DmI de *T. cruzi* (grupo 1A), reveló distensión abdominal y signos de dilatación del estómago y del colon. Las radiografías de los 4 ratones infectados con el aislado EP (grupo 2A), mostraron una mayor distensión abdominal, severa dilatación del estómago y del trayecto del colon (Fig. 1a,b). En relación con los animales con 180 días de infección chagásica crónica, las radiografías del tracto intestinal del grupo 1B formado por 5 ratones, infectados con el aislado DmI mostraron irregularidades en el colon, asociadas a dilataciones en su trayecto. Las radiografías de los 4 ratones del grupo del grupo 2B infectados con el aislado EP, revelaron una mayor distensión abdominal con severas dilataciones del colon, como se observa en las Fig. 2a,b. En la Fig. 2c se muestra la radiografía del tracto digestivo de los ratones sanos controles con aspecto normal. Las alteraciones representadas por dilataciones en el trayecto del tracto gastrointestinal, aunque comunes en todos los animales experimentales, fueron más severas en los ratones con infección crónica producida por el aislado EP de *T. cruzi*. La técnica de bario utilizada en este trabajo no dio buenos

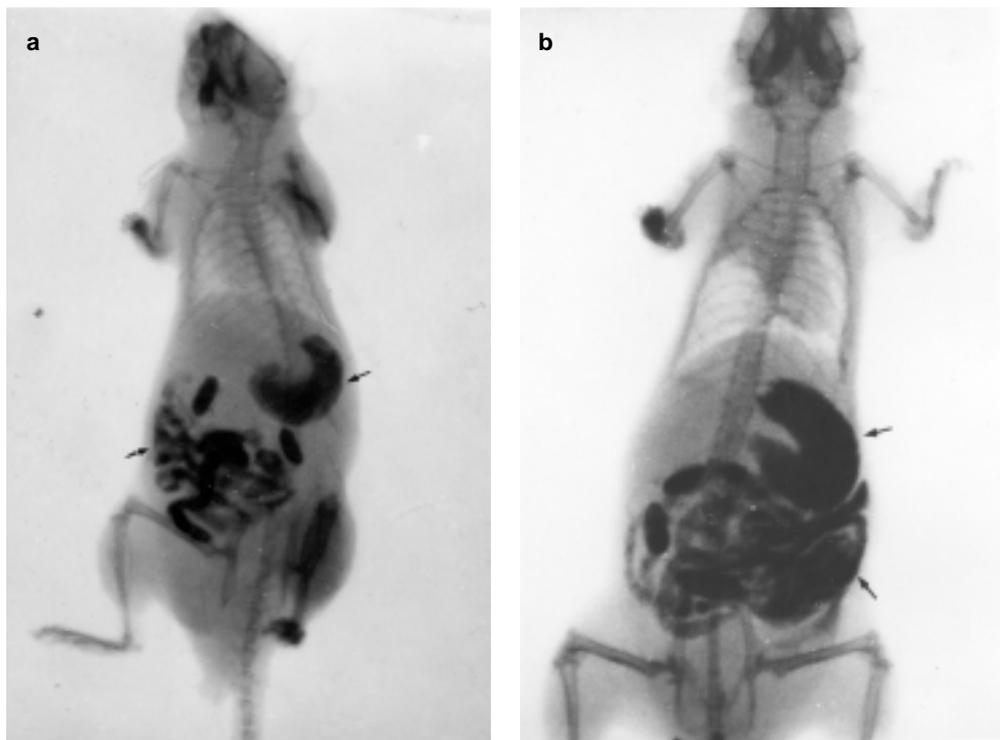


Fig. 1. Radiografías de los ratones con 4 meses de infección que muestran dilatación del estómago y del colon (→). **a.** Con el aislado DmI y **b.** Con el aislado EP de *T. cruzi*.

resultados para el reconocimiento del trayecto esofágico, por lo que no fue visualizado en las radiografías. En la autopsia de los animales infectados no hubo evidencia de distensión esofágica. Anatómicamente el esófago de estos animales con infección chagásica crónica se observó de aspecto normal, mientras que el estómago y el colon se observaron aumentados de tamaño. A pesar de que los órganos señalados no fueron ni medidos ni pesados, sin embargo, fue evidente que en estos animales se produjo un severo proceso de dilatación intestinal.

Estudio histopatológico

Las alteraciones estructurales detectadas en las secciones histológicas del colon de los animales de los grupos 1A y 1B, estuvieron relacionadas con una gran dilatación del colon, importante adelgazamiento de la capa muscular y disminución del grosor de la mucosa, asociado a la pérdida de sus pliegues y de los plexos mioentéricos (Fig. 3a,b). En las Figs. 4a,b se muestran los cambios estructurales del colon de los animales con 4 y 6 meses de infectados con el aislado EP (grupos 2A y 2B), donde se observa la luz intestinal

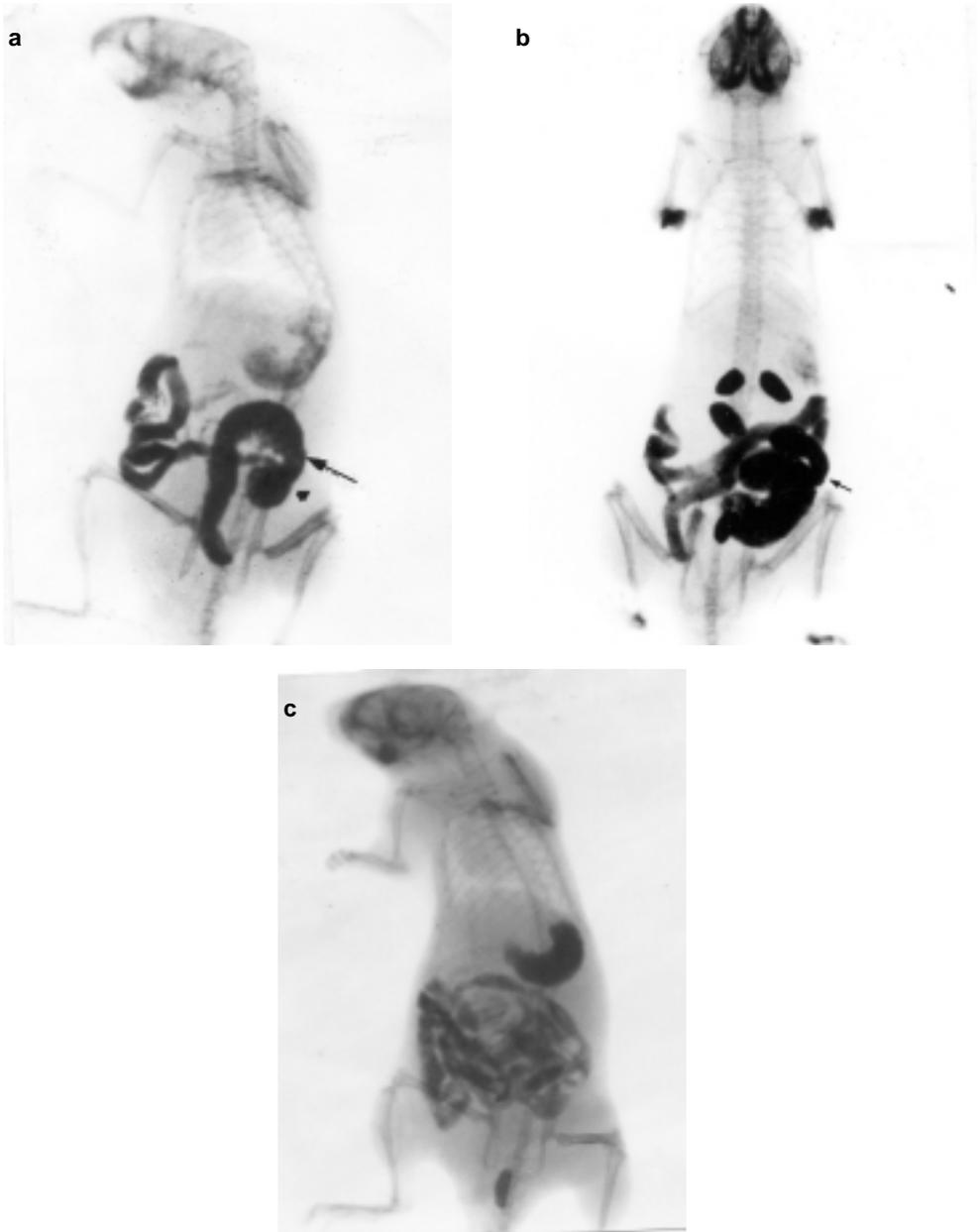


Fig. 2. Radiografías de los ratones a los 6 meses de infección que muestra dilatación del colon (→). **a y b.** Infectados con los aislados DmI y EP de *T. cruzi* respectivamente. **c.** Ratón sano después de la ingesta de bario sin alteraciones en el tracto gastrointestinal.

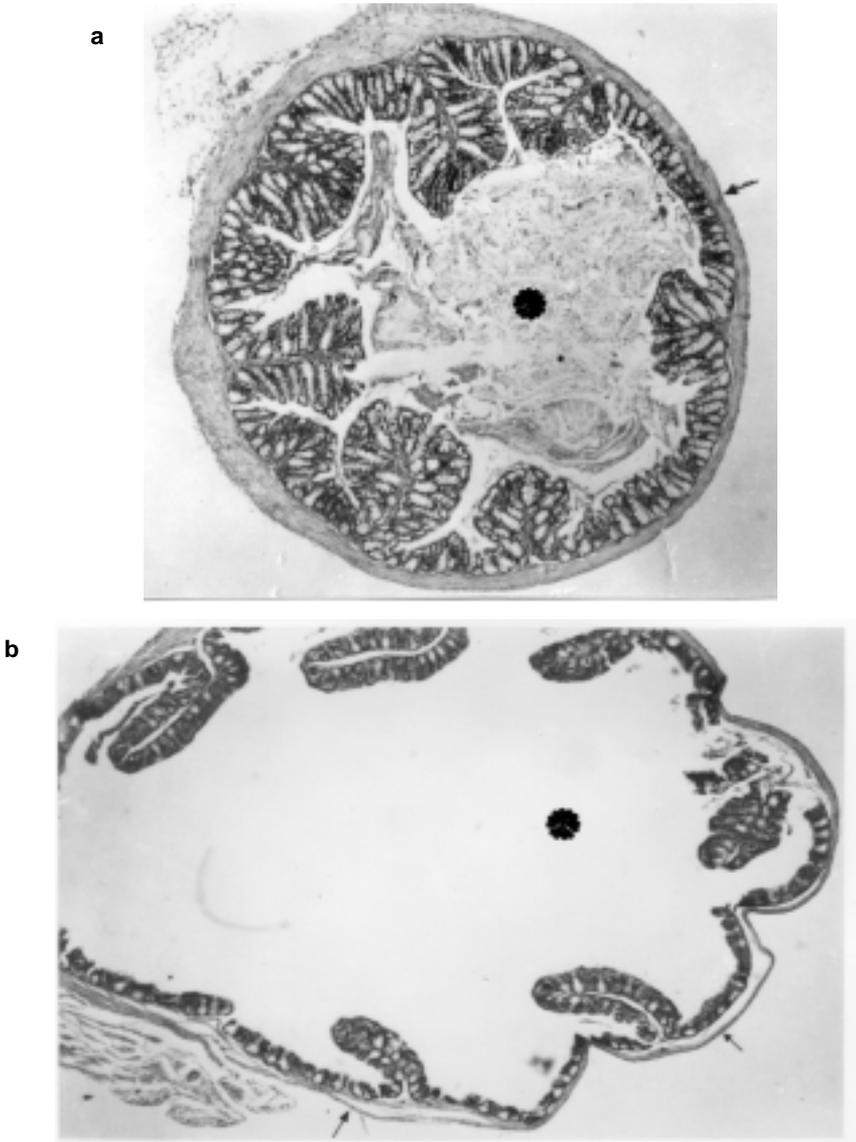


Fig. 3. **a.** Sección histológica del colon de los ratones con 4 meses de infección con el aislado DmI, que muestra adelgazamiento de las capas musculares, disminución de los pliegues (→) y ensanchamiento de la luz intestinal (*). **b.** Sección histológica del colon de los ratones con 6 meses de infección con el aislado DmI, que muestra reducción del grosor de las capas musculares, de los plexos mioentéricos y de los pliegues intestinales (→) y aumento de la luz intestinal (*) (coloración Hematoxilina-Eosina) (Aumento 40X).

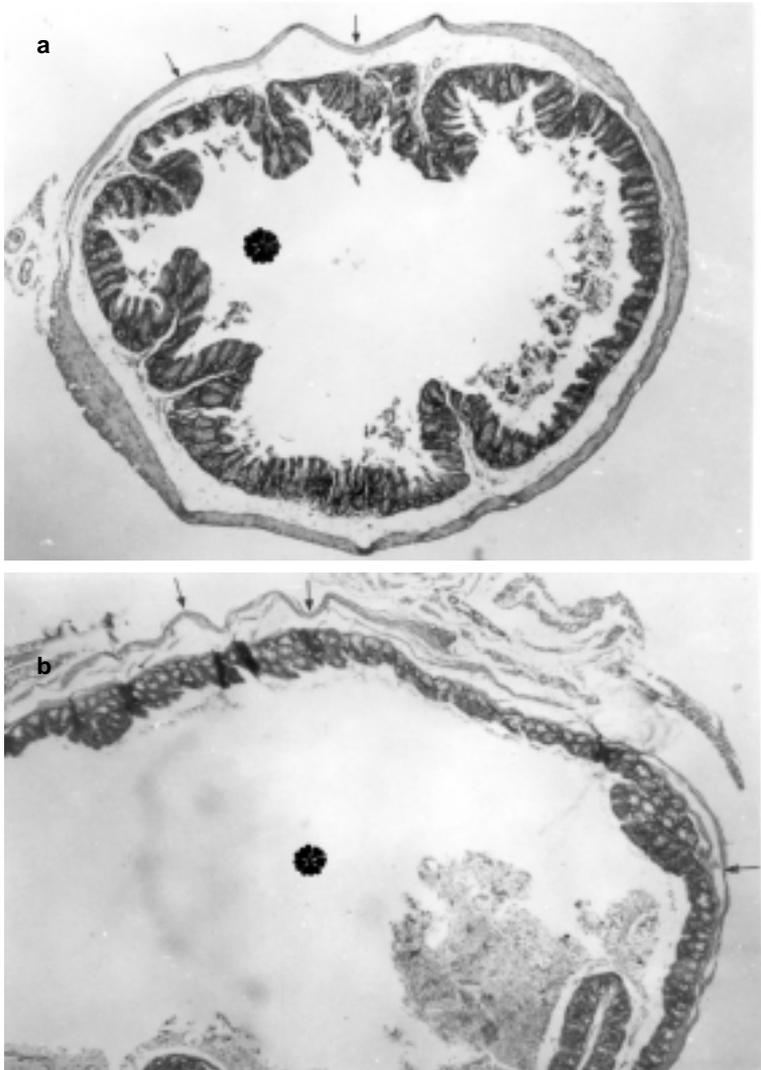


Fig. 4. **a y b.** Secciones histológicas del colon de los ratones con 4 y 6 meses de infectados con el aislado EP de *T. cruzi*, que muestran: Adelgazamiento de las capas musculares, disminución del grosor de la mucosa asociado a la pérdida de los pliegues (→) y ensanchamiento de la luz intestinal (*).

muy amplia la cual contrasta con la luz intestinal estrellada del colon de los ratones sanos (Fig. 4c). Las secciones histológicas del esófago de

los ratones infectados con *T. cruzi*, no presentaron alteraciones histológicas; su estructura fue comparable a la de las secciones de esófago de



Fig. 4. c. Colon de un ratón sano con las capas musculares, los pliegues (→) y la luz intestinal (*) de aspecto normal. (Coloración Hematoxilina-Eosina). (Aumento 40X).

los ratones sanos. Los daños histopatológicos en el estómago y en el colon fueron frecuentemente severos, caracterizados por procesos inflamatorios con células linfomonohistiocitarias, y adelgazamiento de las fibras musculares en las zonas afectadas.

DISCUSIÓN

La apariencia dilatada del tracto gastrointestinal, tanto en humanos como en otros mamíferos, frecuentemente ha sido asociada con la infección chagásica crónica, sobre la base de evidencias clínicas y epidemiológicas en áreas endémicas para la enfermedad de Chagas (8, 17-21), cuando *T. cruzi* no se encuentra en los tejidos o es raramen-

te observado en los ganglios parasimpáticos (22).

Con frecuencia en los pacientes con afectación del tubo digestivo, solo el sigmoides se muestra dilatado aun cuando la entrada del colon se mantenga aumentada de tamaño (23). Esta porción del tubo digestivo aumenta en longitud y posteriormente se produce el aumento del diámetro y el adelgazamiento de la capa muscular circular, y reducción en el número de ganglios del colon durante las etapas tempranas de la infección chagásica (24). En este estudio, el diagnóstico radiológico evidenció el desarrollo de dilatación del estómago y del colon o de ambas regiones del tracto digestivo de los ratones infectados con el aislado DmI de *T. cruzi* de *D. marsupialis*; en los

animales infectados con el aislado EP la dilatación del estómago y del colon fue simultánea. Otras investigaciones han revelado la presencia de estas alteraciones, así como la dilatación de la vejiga urinaria, llamada también megavejiga por Okumura (25, 26), con notable disminución en el número de células del sistema neurovegetativo y lesiones inflamatorias focales en la capa muscular digestiva (27).

Estos hallazgos podrían ser interpretados sobre la base de la relación que existe entre el comportamiento de los parásitos y el modelo animal utilizado, por lo que el estudio de la infección aguda y/o crónica debida a *T. cruzi*, requeriría de por lo menos dos modelos experimentales distintos, que reflejen las condiciones medio ambientales del hospedador y el comportamiento de los parásitos, aún cuando estos procedan de regiones geográficamente distintas (28). Otros estudios han reportado (29) que la distribución de los parásitos en los tejidos y las lesiones que producen se debe más al grado de virulencia que al tropismo exhibido. Prata (30), ha establecido que en los vertebrados el curso de la infección por *T. cruzi* es variable, y depende de las cepas de parásitos, su virulencia, patogenicidad y tropismo. Otros autores (31, 32), consideraron además las diferencias en el comportamiento y en las características de sus componentes, principalmente enzimáticos (zimodemos) y/o del ADN kinetoplasto (schizodemo)

La afección del tracto gastrointestinal debida a la infección experi-

mental con *T. cruzi* presentada en este estudio es consistente con las alteraciones estructurales del tracto digestivo de los animales infectados. Las modificaciones de la mucosa con pérdida de los pliegues y en consecuencia la reducción del grosor de la pared intestinal, producen vaciamiento incompleto del intestino, peristalsis anormal, ausencia de coordinación de la relajación, por lo que la respuesta lenta produce retardo en el tránsito intestinal a nivel del tubo digestivo. Otros autores (33, 10) señalan que durante la evolución de la infección por *T. cruzi*, el megaesófago y el megacolon producen la destrucción de los plexos parasimpáticos intramurales, relacionado probablemente con la infección parasitaria, inflamación y lesiones vasculares secundarias, lo que a nivel del colon alteraría la motilidad y provocaría la dilatación del órgano con retención de las heces, frecuencia de impactación fecal y vólvulo con oclusión intestinal en humanos.

Una de las dificultades para aceptar la relación entre mega-órganos y la enfermedad de Chagas en regiones distintas de Sur América, ha sido atribuida a la existencia de diferentes cepas de *T. cruzi* y a la similitud que muestra la megadilatación del tracto gastrointestinal en pacientes chagásicos con dilataciones secundarias de origen congénito o adquirido. Estas implicaciones hasta ahora no han sido asociadas con la enfermedad de Chagas crónica en Colombia y Venezuela (33, 34), razón por lo que se ha aducido que las cepas de *T. cruzi* prevalentes

en nuestro país no inducen este tipo de patología, considerándose al factor parásito para explicar las diferencias clínicas y regionales en la enfermedad de Chagas. En otras regiones endémicas para la enfermedad de Chagas, como en la región Central de Brazil, la infección por *T. cruzi*, provoca destrucción de las células neuronales en los plexos mientéricos del tubo digestivo, disturbios en la motilidad, achalasia en los esfínteres esofageal y muscular anal y dilatación progresiva de los órganos afectados (35). Otros autores (36-38) han detectado la existencia de megacolon chagásico asociado al cáncer del colon, en pacientes sometidos a estudios radiográficos después de la aplicación de un enema de Bario.

El análisis de los resultados de los exámenes radiológicos e histológicos presentados en este estudio, permite inferir que los dos aislados de *T. cruzi*, obtenidos de dos hospedadores en diferentes áreas geográficas de Venezuela, donde es frecuente la cardiopatía chagásica debida a la infección por *T. cruzi*, fueron capaces de desencadenar desórdenes anatómicos y funcionales del tubo digestivo, así como el desarrollo de dilataciones intestinales, en los ratones infectados. La intensidad de esta sintomatología en estos animales con infección chagásica crónica, sugiere la necesidad de profundizar en el estudio sistemático de la enfermedad de Chagas experimental, con aislados de *T. cruzi* que se encuentran circulando en las diferentes áreas geográficas, afectando sectores poblacionales rurales y urbanos

de naturaleza endémica, donde en algunos casos las evidencias clínicas son las principales herramientas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el CDCHT de la Universidad de Los Andes. Proyectos No. C-910-98-03-B, C-1011-00-03-A y C-1012-00-03-B.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. W.H.O.: Control of Chagas' disease. Technical Report Series. 1991; 811.
2. VOLLERTHUN R.: Histological examination of the footpad of mice after infection with *Trypanosoma cruzi*. Behing Inst Res Com 1980; 66:27-33.
3. PENIN P., DE DIEGO J., DEL REY L., MAYER R., GAMALLO C.: Acute chagasic cardiopathy produced by a strain of *Trypanosoma cruzi* (type I) in an experimental model. nn Para - sitol Hum Comp 1990; 66:27-33.
4. LUGO DE YARBUH A., GUTIERREZ R., COLASANTE C.: Ultrastructural changes in neuromuscular junction of skeletal muscle of the mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Ecol Lat 1999; 6:1-11.
5. PINTO J.C.: Enfermedad de Chagas. Epidemiología clínica y terapéutica. Programa de salud. B. Aires 1985.

6. REZENDE J M., LUQUETTI O.: Chagasic megavisceras. In Chagas' disease and the nervous system. PAHO Sci Publ 1994; 547:149-171.
7. ANDRADE Z A., ANDRADE S.: O Coracao nos "megas" do aparelho digestivo. O Hospital 1967; 71:129-136.
8. REZENDE J.M., MOREIRA H.: Chagasic megaesophagus and megacolon. Historical review and present concepts. Arq Gastroenterol 1988; 25:32.
9. MARSDEN P.D., ALVARENGA N.J., SOARES V.A., GAMA P.: Attempts to produce megasyndrome in mice stocks of *Trypanosoma cruzi* associated with megaesophagus in man. Trans R Soc Trop Med Hyg 1979; 73: 651-655.
10. DEBAS H.T., MULVIHILL M.D.: Neuroendocrine design of the quit. Am J Surg 1991; 161: 243-249.
11. ACUNA M., ROTHHAMMER F., MORENO R., BARTON R., AMDABA A.: Evidence corroborates Neghme hypothesis concerning mildness of American tripanosomiasis in Chile. Rev Med Chile 1992; 120:233-238.
12. DE SOUSA M., ANDRADE S.G., BARBOSA Jr A A., MACEDO R.T., FERREIRA V.A.: *Trypanosoma cruzi* strains and autonomic nervous system. Pathology in experimental Chagas' disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91:217-224.
13. KOBERLE F.: Pathogenesis of Chagas' disease in: Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special references to Chagas disease. CIBA Foundation Symposium, 20 Amsterdam: Associated Scientific Publishers 1974; 137-158.
14. GONZALEZ N., GALINDO I., GUEVARA P., NOVAX E., SCORZA J., AÑEZ N., DA SILVERA J., RAMIREZ J.: Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. J Clin Microbiol 1994; 32:153-158.
15. MORENO E., AÑEZ N., GOTTLBER C., SCORZA C., LUGO DE YARBUH A., DAVILA D.: Modificaciones electrocardiográficas en ratas infectadas con formas sanguíneas y metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*. Bol Dir Malar San Amb 1996; 36: 70-77.
16. BRENER Z.: Observacoes sobre a inmunidade a superinfecciones em camundongos experimentalmente inoculados con *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1962; 4:119-123.
17. BARRETO A.C.P., MADY C.: Forma indeterminada da doenca de Chagas. Arq Bras Cardiol 1986; 47:299-302.
18. MACEDO J.F., MENEGHELLI U.G., OLIVEIRA R.B., GODOY R.A., TRONCON I.E., DANTAS R.O.: Effect of CCK-OP and intraduodenal administration of

- essential amino acids on intraluminal pressures of sigmoid and rectum in patients with chagasic megacolon. *Dig Dis Sci* 1986; 31:145-150.
19. MENEGHELLI U.: Chagas' disease: a model of denervation in the study of digestive tract motility. *Braz J Med Biol Res* 1985; 55:255-264.
 20. DANTAS R.O., GODOY R.A., OLIVEIRA R.B., MENEGHELLI U.G., TRONCON L.E.A.: Lower esophageal sphincter pressure in Chagas' disease. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 508-512.
 21. GUIMARAES J.P.: Megaesofago em *Macaco rhesus* pelo *S. cruzi*. Comunicacao ao Congresso Internacional sobre a Doença de Chagas. Rio de Janeiro. 1959.
 22. KOBERLE F., ALCANTARA F.G.: Mecanismos de destrucao neuronal do sistema nervoso periferico na molestia de Chagas. *O Hospital* 1960; 57:1057-1064.
 23. EARLAM R.: Gastrointestinal aspects of Chaga's disease. *Dig Dis Sci* 1972; 17: 559-571.
 24. KOBERLE F.: Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 1968; 6:63-116.
 25. OKUMURA M., BRITO T., SILVA L H P., DA SILVA A.C., CORREA-NETTO A.: The pathology of experimental Chagas' disease in mice: I. Digestive changes with a reference to necrotizing arteritis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1960; 2:17-28.
 26. OKUMURA M., CORREA-NETTO A.: Producao experimental de "megas" em animais inoculados com *Trypanosoma cruzi*. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 1961; 16:338-341.
 27. HUDSON L., RIBEIRO-DOS SANTOS R.: Immunological aspects of chagasic cardiopathy. In *Immunological aspects of cardiovascular disease*, Lessof, M. H. (editor). 1981; New York: Marcel Dekker Inc.
 28. HUDSON L.: Immunobiology of *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75: 493-498.
 29. DEANE M., BRITO T., DEANE L.: Pathogenicity to mice of some strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from wild animals of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1963; 5:225-235.
 30. PRATA A.: Relacao etiologica entre doenca de Chagas e megaesofago. *An Cong Int Doenca Chagas* 1963; 4:1317-1336.
 31. MILES M.A., LAHAM S.M., SOUZA A.A., POVOA M.: Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980; 74: 221-237.
 32. MOREL C., CHIARI E., PLESSMAN-CAMARGO E., MATTEI D., ROMANHA A., SIMPSON L.: Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern

- of restriction endonuclease products of kinetoplast-DNA minicircles. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 6810-6814.
33. REZENDE J.M.: Chagasic megasyndromes and regional differences. New Approaches in American Trypanosomiasis Research PAHO, Washington D.C Scientific pub 1976; 318: 159-205.
34. KIRCHOFF I.V.: American trypanosomiasis (Chagas' disease). Gastroenterol Clin North Am 2000; 25:517-533.
35. REZENDE J.M., LUQUETTI A.O.: Chagasic megavisceras. Chagas' disease and the Nervous System. Washington, D.C: Pan Am Health Org, Scientific Publication 1994; 547.
36. LOPEZ E.R.: Megaesofago, megacolon e cancer. Rev Soc Bras Med Trop 1988; 21: 91-94.
37. MENEZES A.C., LOPES M.A., ROCHA A., FATURETO M.C., LOPES G.P., LOPES F.R., CHAPADEIRO E.: Megas e cancer. Cancer de intestino grosso em chagasicos com megacolon. Arq Gastroenterol 1989; 26: 13-16.
38. OLIVEIRA E CH., BRASIL-LEITE M.S., LUQUETTI A., ALMEIDA A.C., MOREIRA H., Chagasic megacolon associated with cancer. Am J Trop Med Hyg 1997; 56: 596-598.