

Morfometría ultraestructural de la glándula adrenal de ratones infectados experimentalmente con dos aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi*

Ultrastructural morphometry of the adrenal gland of mice experimentally infected with two Venezuelan isolates of Trypanosoma evansi

FÉLIX TEJERO¹, CARLOS RONDÓN DE VIVO¹, ANTONIO ROSCHMAN GONZÁLEZ²,
PEDRO M. ASO³, HÉCTOR J FINOL²

RESUMEN

Este trabajo describe cualitativamente y analiza cuantitativamente las variaciones ultraestructurales de la glándula adrenal de ratones durante el desarrollo de infecciones murinas experimentales por dos aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi*, uno proveniente de asno y otro de caballo. Las modificaciones submicroscópicas observadas incluyeron alteraciones en el retículo endoplasmático liso, mitocondrias, gotas lipídicas, aparato de Golgi y núcleo. También se apreciaron alteraciones en el número de vesículas de epinefrina, norepinefrina, gránulos de lipofucsina y presencia singular de figuras mielínicas. Estos cambios ultraestructurales estarían asociados a problemas metabólicos que inducirían la muerte de los animales infectados. El estudio cuantitativo demostró diferencias significativas en las características y las magnitudes del daño causado por ambos aislados, siendo el tripanosoma proveniente de caballo más patógeno. El análisis multivariante de los cambios submicroscópicos discriminó la acción patogénica en la glándula adrenal de tripanosomas de la misma especie que provienen de hábitats diferentes (*Equus asinus* y *E. caballus*) y de zonas geográficas distintas (estado Apure y estado Guárico).

Palabras clave: *Trypanosoma evansi*, ultraestructura, glándula adrenal.

ABSTRACT

This work describes qualitatively and analyzes quantitatively the ultrastructural variations of the mice adrenal gland during the development of murine experimental infections by two Venezuelan isolates of *Trypanosoma evansi*, one derived from a donkey and another from a horse. The submicroscopic modifications included modifications in the smooth endoplasmic reticulum, mitochondria, lipid droplets, Golgi apparatus, and nucleus. Alterations in the number of epinephrine, norepinephrine vesicles, and lipofuscin granules and singular myelin-like figures were also observed. Such ultrastructural changes would be associated to metabolic problems including the infected animal's death. The quantitative study demonstrated significant differences in the characteristics and magnitude of the damage caused by both isolates, being more pathogenic the horse derived trypanosome. The multivariate analysis of the submicroscopic changes discriminated the pathogenic action of trypanosomes of the same species coming from different habitats (*Equus asinus* and *E. caballus*) and different geographic zones (Apure state and Guarico state) in the adrenal gland.

Key words: *Trypanosoma evansi*, ultrastructure, adrenal gland.

¹ Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

² Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

³ Departamento de Biología Celular, Universidad Simón Bolívar. Caracas.

Correspondencia: Dr. Felix Tejero. Apartado 66291. Plaza Las Américas. Caracas 1061. Venezuela.
Tlf.: +58(212)6051647; email: felixtejero@gmail.com, felix.tejero@ciens.ucv.ve.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma evansi es un Trypanosomatidae ubicado en la sección Salivaria ampliamente distribuido en las zonas intertropicales donde causa la tripanosomosis equina (1). En los Llanos venezolanos presenta elevada seroprevalencia (2) y por postrar al ganado equino (3), menoscaba la producción y la productividad pecuarias (4) lo que, colateralmente, deteriora las condiciones socio-económicas de los habitantes de las zonas afectadas (5).

El *T. evansi* interactúa con diversos tejidos y órganos de diferentes mamíferos (1), incluyendo la glándula adrenal (6).

Las glándulas adrenales son órganos complejos y multifuncionales constituidos por dos regiones, corteza y médula; zonas que además de tener origen embriológico diferente, mesodérmico y ectodérmico respectivamente, se diferencian en estructura y función. Las adrenales sintetizan hormonas encargadas de mantener la homeostasis somática, participar en el control de la función renal y regular las respuestas al estrés. La corteza adrenal, al igual que la mayoría de las glándulas endocrinas, es regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-glándula y sintetiza moléculas críticas en el metabolismo, las reacciones inflamatorias y la homeostasis de los fluidos corporales como son, aldosterona, cortisona, cortisol, corticosterona, andrógenos y estrógenos. Por su parte, la médula adrenal está íntimamente relacionada al Sistema Nervioso Simpático y sintetiza, almacena y secreta epinefrina y norepinefrina (7).

La glándula adrenal es un órgano muy irrigado (8), propenso en consecuencia, a la extravasación del arsenal proteolítico excretado por *T. evansi* y/o expuesto por su lisis (6). En diversas tripanosomiasis africanas se han descrito sustancias biológicas involucradas en la aparición de lesiones en tejidos irrigados (9). Cambios en la concentración de cortisol hemático (10), variaciones en los niveles de potasio sérico (11) e insuficiencia adrenal (12), son trastornos descritos en infecciones murinas experimentales por tripanosomas Salivaria diferentes al *T. evansi* que podrían tener relación directa con daños en la glándula adrenal.

Aun cuando los cambios ultraestructurales en la corteza adrenal sometida a estrés por la presencia de *T. evansi* han sido descritos (6), no hay información referente a sus consecuencias en la médula adrenal y tam-

poco se han comparado, ni cualitativa ni cuantitativamente, los daños ocasionados en corteza y médula por aislados venezolanos del parásito.

Este trabajo describe cambios patológicos ultraestructurales en corteza y médula adrenal, y compara cuantitativamente la acción patogénica de dos aislados venezolanos de *T. evansi* en un modelo murino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lotes de ratones hembra NMRI de 20 gr de peso corporal, equivalente a 9 semanas de edad (13) del Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, fueron inoculados intradérmicamente (1 tripomastigote/gr peso corporal), con dos aislados locales de *T. evansi*, uno obtenido de *Equus asinus* (MEQD/VE/99/Trino) (14) y otro de *E. caballus* (TeAp-Mantecal01) (15), mantenidos en N₂ líquido (16) desde su aislamiento hasta su uso. El diseño experimental incluyó tres grupos de 10 ratones cada uno: grupo 1, ratones infectados con *T. evansi* obtenido de *E. asinus*; grupo 2, ratones infectados con *T. evansi* proveniente de *E. caballus*; y grupo 3, ratones control (inoculados con solución salina).

Desde el tercer día post-inoculación y hasta la muerte de todos los animales, interdiaria y aleatoriamente, de cada grupo (ratones infectados con *T. evansi* proveniente de *E. asinus*, obtenido de *E. caballus* y control sin tripanosomas) se retiró un ratón que fue sacrificado en atmósfera saturada de monóxido de carbono. Mediante ablación quirúrgica se extrajeron las glándulas adrenales, se depositaron en un plato de Petri con solución fijadora de Karnovsky (17), fueron seccionadas sistemáticamente en cubos de unos 2 mm³ y se procesaron con la técnica rutinaria de microscopía electrónica de transmisión. Como primer fijador se utilizó la solución de Karnovsky (glutaraldehído 2,5%, formaldehído 37% y tampón fosfato de Millonig a pH 7,4 y 320 mOsm). Luego de lavar las muestras con solución tampón de Millonig (18) fueron postfijadas con tetróxido de osmio al 1% en las mismas condiciones de pH y osmolaridad. Después, fueron lavadas en agua destilada y se deshidrataron en soluciones acuosas de etanol de concentración ascendente (50, 70, 90, 95%) y etanol puro (100%: mantenido en silicio en gel). Posteriormente, se infiltraron con óxido de propileno (2 cambios), óxido de propileno-epon 1:1 (1 cambio) y se incluyeron en resina epóxica (EM-bed 812,

9 ml; DDSA, 6 ml; NMA, 5 ml; y DMP-30, 0,5 ml) durante 48 h a 60 °C. Los bloques fueron tallados y seccionados a 60-90 nm con cuchilla de diamante. Los cortes finos contrastados con acetato de uranilo (19) y citrato de plomo (20) fueron examinados con un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011 (80 kV). El registro permanente se realizó en formato digital.

Mediante el programa de dominio público "Image Processing and Analysis in Java" (ImageJ), sobre las micrografías digitales se registraron las magnitudes numéricas de variables significativas en la fisiología adrenal. En la corteza: por producir esteroides, amplitud de las cisternas del retículo endoplasmático liso (ϕ -REL). En la médula: número de vesículas de adrenalina (#VA) por estar directamente asociada al estrés. Adicionalmente, tanto en corteza como en médula se determinaron los valores del número de perfiles mitocondriales (#PM), área de los perfiles mitocondriales (APM) y el número de crestas mitocondriales/perfil mitocondrial (#CM/PM), ya que la mitocondria está vinculada a la generación de energía y está involucrada en la energética de los procesos de exocitosis; también se halló el área de las inclusiones lipídicas (AIL) y número de inclusiones lipídicas (#IL) por constituir un compartimiento importante en el almacenaje de energía y suministrar moléculas en la síntesis y reparación de membranas y por generar energía vía β -oxidación; igualmente se precisó el número de ribosomas libres (#RL) y número de ribosomas sobre las cisternas del retículo endoplasmático rugoso (#RRER) por cuanto son responsables del ensamblaje de las proteínas celulares; se especificó el número de gránulos de lipofucsina (#GLF), ya que son cuerpos residuales derivados de gránulos autofágicos que corresponden a material no digerido proveniente de la peroxidación intracelular de los lípidos; se estableció el número de figuras mielínicas (#FM), ya que se desarrollan en células disminuidas o no funcionales; y por último, se halló el área nuclear (AN) por ser el centro de control celular.

Todas las magnitudes numéricas generadas se estudiaron cuantitativamente con Análisis de la Varianza (ANOVA), Análisis de Regresión Lineal Simple (ARLS) (21), Distancias de Mahalanobis (22) y Análisis Discriminante Múltiple (ADM) (23). El programa Statistica 8.0 se empleó en los análisis estadísticos.

Todos los experimentos cumplieron con las normas de cuidado y uso de animales de laboratorio (24), ha-

ciéndose por triplicado y repitiéndose tres veces con nuevos lotes de ratones procedentes del bioterio y de parásitos extraídos del N₂ líquido.

RESULTADOS

La supervivencia de los animales experimentales fue afectada por la infección, ya que todos los ratones del grupo control sobrevivieron al tiempo de experimentación, mientras que la mortalidad de los infectados con *T. evansi* fue del 100%, a los 17 días con el aislado MEQD/VE/99/Trino, proveniente de *E. asinus*, y a los 15 días con TeAp-Mantecal01, obtenido de *E. caballus*.

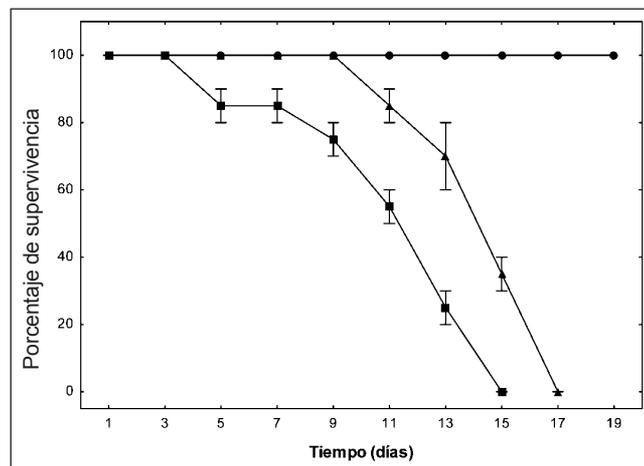


Figura 1. Supervivencia murina en los grupos experimentales. ●: ratones control; ▲: ratones infectados con MEQD/VE/99/Trino; y ■: ratones infectados con TeAp-Mantecal01.

Las características de las curvas de supervivencia indican que el aislado obtenido de caballo es más agresivo que su contraparte de asno.

El análisis cualitativo de las micrografías reveló cambios ultraestructurales entre los grupos no infectados y los grupos infectados.

Los animales no infectados (control) no revelaron cambios submicroscópicos ni en la corteza adrenal ni en la médula adrenal (Fig. 2).

Los registros ultraestructurales mostraron cambios cualitativos en las características de las cisternas del retículo endoplasmático liso (ϕ -REL), observándose incremento en su amplitud (Fig. 3).

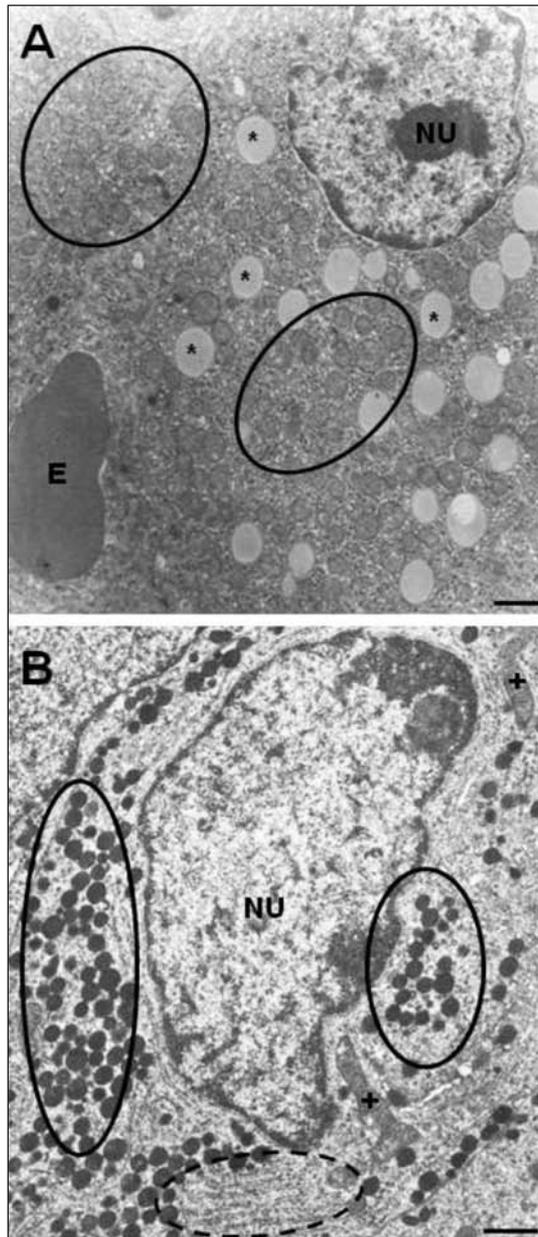


Figura 2. Células de corteza y médula adrenal en animales control. A. Sección de la corteza adrenal en la que no se observan alteraciones ultraestructurales. En la micrografía se muestran inclusiones lipídicas (asteriscos), mitocondrias con crestas tubulares (óvalos de línea continua), el núcleo y el nucléolo de una célula cortical (NU) y un capilar con un eritrocito en su interior (E). Micromarca = 1 μ m. B. Sección de médula adrenal que muestra un núcleo (NU), mitocondrias alargadas de crestas laminares (signo más) abundante retículo endoplasmático liso (óvalo de línea discontinua) y gránulos de epinefrina (óvalos de línea continua). Micromarca = 1 μ m.

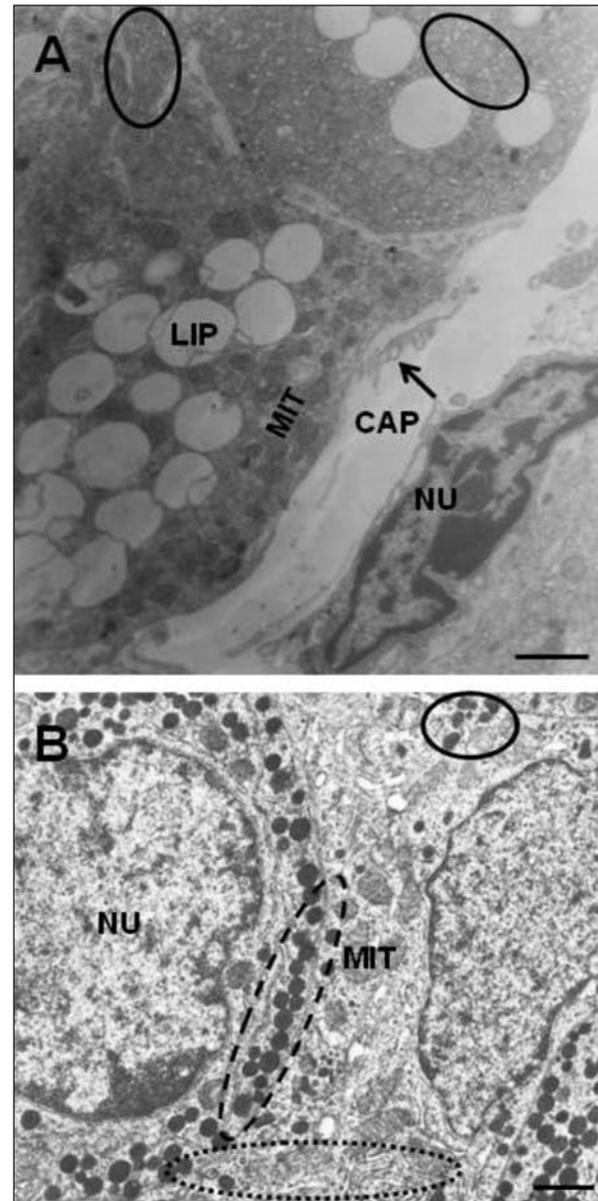


Figura 3. Retículo endoplasmático liso en células de corteza y médula adrenal. A. Micrografía de corteza adrenal en la que destaca el hinchamiento de las cisternas del retículo endoplasmático liso (óvalos). Se observan gotas lipídicas atípicas (LIP), mitocondrias con crestas ligeramente hinchadas (MIT), un capilar (CAP), un núcleo del endotelio vascular de contornos irregulares (UN) y degeneración del endotelio (flecha). Aislado obtenido de *Equus asinus*. Micromarca: 1 μ m. B. Micrografía de médula adrenal en la que se observan gránulos de norepinefrina (óvalo) y epinefrina (óvalo línea discontinua), mitocondrias alteradas (MIT) y abundante retículo endoplasmático liso (óvalo de línea punteada). Aislado proveniente de *Equus asinus*. Micromarca: 2 μ m.

Las micrografías electrónicas también evidenciaron cambios mitocondriales en células corticales y medulares. Los cambios mitocondriales incluyeron disminución de tamaño, hipertrofia y degeneración de las crestas. También revelaron pérdida de matriz mitocondrial con reducción en la densidad electrónica (Fig. 4).

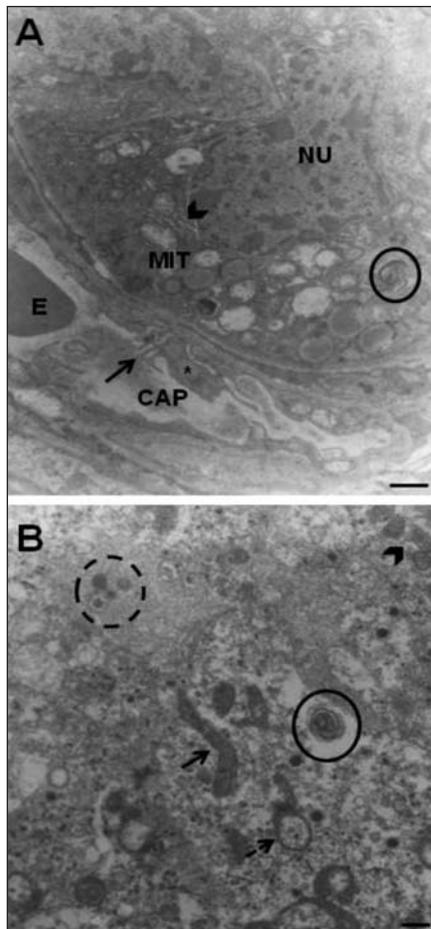


Figura 4. Cambios mitocondriales en células de corteza y médula adrenal. **A.** Micrografía de corteza que muestra núcleos celulares (NU), mitocondrias hinchadas (MIT). Figuras mielínicas (círculo) y Golgi con cisternas dilatadas. También se observa un capilar (CAP) con un eritrocito (E), pared endotelial de diferentes grosores (asterisco) y prolongaciones endoteliales proyectadas hacia el lumen capilar (cabeza de flecha). Aislado obtenido de *Equus caballus*. Micromarca: 1,5 μm . **B.** Micrografía de médula adrenal en la que destacan gránulos de norepinefrina (círculo de línea discontinua), mitocondrias arqueadas (flecha), mitocondrias anulares (flecha de línea discontinua), ambas anómalas, mitocondrias normales (cabeza de flecha) y figuras mielínicas (círculo). Aislado obtenido de *Equus caballus*. Micromarca: 3 μm .

La microscopía electrónica de transmisión también evidenció modificaciones en las características de las gotas lipídicas (Fig. 5).

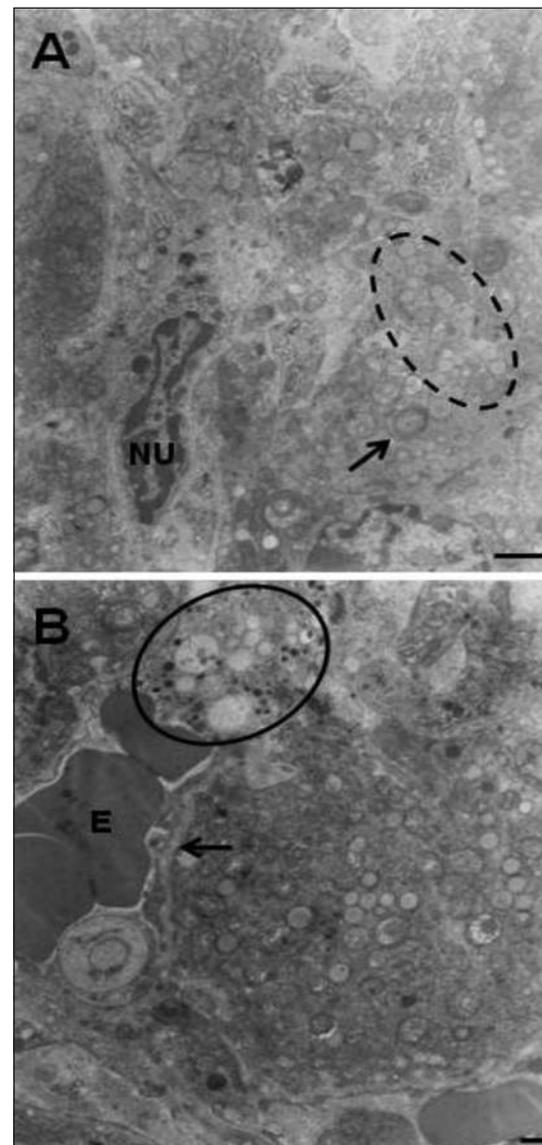


Figura 5. Modificaciones en las gotas lipídicas en células de corteza y médula adrenal. **A.** Micrografía de corteza que evidencia núcleo endotelial hiper cromático de contornos irregulares (NU), figuras mielínicas (flecha) e inclusiones lipídicas (óvalo de línea discontinua). Aislado obtenido de *Equus asinus*. Micromarca: 1 μm . **B.** Micrografía de médula adrenal en la que destaca un capilar (flecha) conteniendo eritrocitos (E), gránulos de epinefrina (óvalo de línea continua), gotas de lípidos (asterisco) y mitocondrias (signo más). Aislado proveniente de *Equus asinus*. Micromarca: 1 μm .

Por su parte, la presencia de tripomastigotes en el interior de células de la corteza adrenal fue constatada a partir del día 9 y 7 en las infecciones derivadas de *E. asinus* y *E. caballus*, respectivamente (Fig. 6).

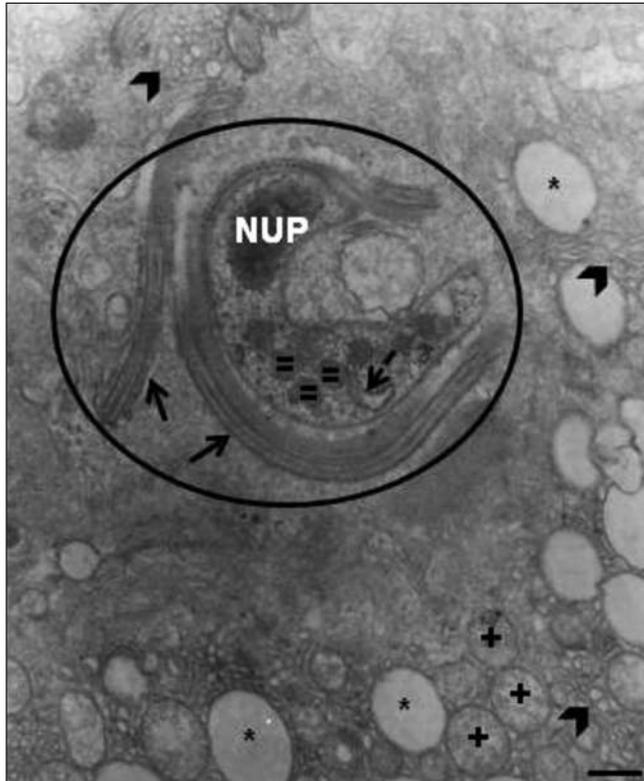


Figura 6. Corte fino de corteza adrenal en el que destaca un tripanosoma obtenido de *Equus caballus* (óvalo) en el interior de una célula cortical. En el citoplasma de la célula se observan cisternas distendidas de retículo endoplasmático liso (cabezas de flecha), inclusiones lipídicas (asteriscos) y mitocondrias ligeramente hinchadas (signo más). En el tripanosoma de destaca el núcleo (NUP), el flagelo con su axonema (flechas de línea continua), parte de la mitocondria única de estos organismos (flecha de línea discontinua) y los glicosomas (signo igual). Micromarca: 500 nm.

El análisis cualitativo de la ultraestructura cortical y medular adicionalmente reveló gotas lipídicas atípicas (Fig. 2), cisternas del Golgi ensanchadas (Fig. 3), incremento progresivo en el número de figuras mielínicas (Fig. 3, Fig. 5), mitocondrias anulares y arqueadas (Fig. 3), número variable de vesículas de epinefrina, norepinefrina y degeneración nuclear progresiva (Fig. 2, Fig. 3).

El análisis del cambio submicroscópico también se abordó cuantitativamente. El ANOVA es una prueba que determina si existen diferencias en la media aritmética de una variable dependiente o respuesta, que es afectada por una o más variables independientes (21). Antes de adelantar el ANOVA se corroboró que los datos cumplirían con los requisitos de normalidad con el estadístico Kolmogorov-Smirnov (25), homogeneidad de la varianza con la prueba de Fligner-Killeen (26) e independencia con el análisis de residuales (21).

La Tabla 1 contiene los resultados obtenidos en un ANOVA de 4-vías que exploró las interacciones entre las fuentes de variación y sus acciones recíprocas. Sólo se presentaron los estadísticos F y p; F corresponde a la F de Fisher y p es la probabilidad asociada al evento, en este caso, 95%.

El ANOVA demostró diferencias significativas en los cambios inducidos por ambos aislados tanto en corteza como en médula dependientes del tiempo (expresado en días), la infección (animales infectados y controles), el aislado (MEQD/VE/99/Trino y TeAp-Mantecal01), así como de la región adrenal (corteza y médula). También evidenció diferencias significativas en las interacciones de las fuentes de variación. Las medias de los cambios en las 12 variables causados por el tiempo, la presencia de infección, el aislado de *T. evansi* y la región de la glándula adrenal fueron significativamente diferentes. Las interacciones estiman el efecto de un factor de variación sobre la variable dependiente que está subordinada a otro factor. Las medias de las magnitudes numéricas de las variables registradas en las interacciones Tiempo-Infección, Tiempo-Aislado, Infección-Aislado e Infección-Región adrenal resultaron significativamente diferentes, pero las medias de las magnitudes numéricas de las variables registradas en las interacciones Tiempo-Región adrenal y Aislado-Región adrenal fueron similares.

Otro test estadístico realizado sobre los datos registrados fue el ARLS (Tabla 2), una prueba que permite investigar los efectos de una variable sobre otra (21).

La pendiente de la recta de regresión (m) suministra una idea de velocidad de cambio en el modelo lineal obtenido, ya que su expresión numérica ($m = \Delta Y / \Delta X$) relaciona el cambio dimensional (eje X) con respecto al tiempo (eje Y). En la medida que el valor absoluto de m aumenta, mayor será la velocidad de cambio. El signo

Tabla 1

Resumen de los resultados del Análisis de la Varianza de 4 vías sobre las magnitudes numéricas de variables registradas. ϕ -REL: amplitud en μm de las cisternas del retículo endoplasmático liso; #VA: número de vesículas de adrenalina; #PM: número de perfiles mitocondriales; APM: área de los perfiles mitocondriales; #CM/PM: número de crestas mitocondriales/perfil mitocondrial; #IL: número de inclusiones lipídicas; AIL: área de las inclusiones lipídicas; #RL: número de ribosomas libres; #RRER: número de ribosomas adosados al retículo endoplasmático rugos; #GLF: número de gránulos de lipofucsina #FM: número de formas mielínicas; AN: área del núcleo; F: F de Fisher; p: probabilidad asociada para $\alpha = 0,05$ (significancia $p < 0,05$).

Variables	Fuente Variación	Tiempo	Infección	Aislado	Región adrenal	Interacción Tiempo Infección	Interacción Tiempo Aislado	Interacción Tiempo Región adrenal	Interacción Infección Aislado	Interacción Infección Región adrenal	Interacción Aislado Región adrenal
ϕ -REL	F p	79,30 0,00	35,26 0,01	20,29 0,01	37,90 0,00	83,92 0,00	21,41 0,01	1,76 0,75	85,52 0,00	98,36 0,00	0,27 0,92
#VA	F p	53,42 0,00	45,95 0,00	11,76 0,05	38,21 0,00	76,57 0,00	20,71 0,01	3,48 0,72	64,36 0,00	84,82 0,00	0,21 0,94
#PM	F p	35,98 0,00	54,91 0,00	62,42 0,00	39,12 0,01	70,75 0,00	27,47 0,01	2,63 0,73	73,91 0,00	85,32 0,00	0,29 0,00
APM	F P	63,42 0,00	40,06 0,00	16,76 0,04	27,15 0,04	82,67 0,00	19,43 0,02	1,22 0,83	75,03 0,00	94,53 0,00	0,45 0,95
#CM/PM	F p	74,20 0,00	46,87 0,00	19,61 0,03	31,77 0,02	96,72 0,00	27,62 0,02	2,97 0,65	81,05 0,00	79,54 0,00	0,61 0,84
AIL	F p	63,91 0,00	53,63 0,00	27,17 0,01	32,73 0,01	63,75 0,00	29,77 0,04	1,44 0,94	75,65 0,00	73,62 0,00	0,72 0,87
#IL	F p	68,20 0,00	49,81 0,00	22,97 0,02	37,53 0,00	73,55 0,00	27,09 0,00	1,27 0,89	78,33 0,00	91,93 0,00	0,23 0,91
#RL	F p	72,07 0,00	61,61 0,01	29,53 0,02	41,35 0,02	77,02 0,00	31,29 0,03	2,09 0,90	81,02 0,00	90,82 0,00	0,19 0,93
#RRER	F p	84,32 0,00	72,08 0,00	34,55 0,01	48,38 0,02	90,11 0,00	36,61 0,04	2,45 0,92	94,79 0,00	98,34 0,00	0,22 0,92
#GLF	F p	66,62 0,00	78,57 0,00	33,43 0,01	52,73 0,02	98,22 0,00	27,63 0,03	1,15 0,96	98,12 0,00	99,35 0,00	0,26 0,93
#FM	F p	72,80 0,00	65,52 0,00	30,12 0,02	45,00 0,02	84,73 0,02	30,65 0,00	1,74 0,02	88,07 0,00	95,13 0,00	0,23 0,92
AN	F P	82,84 9,00	87,44 0,00	31,76 0,04	34,08 0,01	75,04 0,00	31,97 0,04	1,55 0,96	97,77 0,00	73,49 0,01	0,36 0,93

de m establece la dirección del cambio, creciente si $m > 0$ y decreciente si $m < 0$.

El análisis demostró que los cambios submicroscópicos inducidos en ambas regiones adrenales por el aislado proveniente de *E. caballus* fueron más rápidos que

los observados con el aislado obtenido de *E. asinus* (Tabla 2).

El coeficiente de determinación (R^2) representa la proporción de variación explicada por la regresión. Es una medida relativa del grado de asociación lineal entre

los ejes X-Y e indica el porcentaje de la variación de Y (dimensionalidad) que se explica a través del comportamiento de X (tiempo). En la medida que la magnitud numérica de R^2 sea mayor, mejor será el modelo lineal prediciendo el comportamiento de la variable Y, por lo tanto, R^2 es el porcentaje de varianza explicado por la recta de regresión ($0 \leq R^2 \leq 1$) (21).

Los valores calculados de R^2 ($0,72 \leq R^2 \leq 1,00$) garantizan la robustez de los modelos lineales calculados (21).

La probabilidad asociada a los eventos estudiados en un intervalo de confianza del 95% avala lo inferido por los modelos de ARLS; todos los casos fueron significantes, $p < 0,05$ (Tabla 2).

Las magnitudes numéricas de las 12 variables registradas también se sometieron al escrutinio del ADM,

una prueba multivariante que establece relaciones lineales entre variables continuas, separa en grupos los objetos investigados y, simultáneamente, minimiza la probabilidad de distorsión al asignar la pertenencia de los individuos a un grupo determinado. El ADM genera un modelo matemático a partir de las variables predictoras en el que se extraen los factores ortogonales que mejor discriminan los casos, representándolos en un sistema coordenadas cartesianas (23).

La Fig. 7 muestra seis nubes de puntos que ubican a los grupos originales (corteza adrenal de ratones control, médula adrenal de ratones control, corteza adrenal de ratones infectados con *T. evansi* obtenido de asno, médula adrenal de ratones inoculados con *T. evansi* proveniente de asno, corteza adrenal de ratones inyectados con *T. evansi* obtenido de caballo y médula adrenal de ratones infectados con *T. evansi* procedente de

Tabla 2

Resultados relevantes del Análisis de Regresión Simple sobre las magnitudes numéricas de las variables registradas. ϕ -REL: amplitud en μm de las cisternas del retículo endoplasmático liso; #VA: número de vesículas de adrenalina; #PM: número de perfiles mitocondriales; APM: área de los perfiles mitocondriales; #CM/PM: número de crestas mitocondriales/perfil mitocondrial; #IL: número de inclusiones lipídicas AIL: área de las inclusiones lipídicas; #RL: número de ribosomas libres; #RRER: número de ribosomas adosados al retículo endoplasmático rugoso; #GLF: número de gránulos de lipofucsina; #FM: número de formas mielínicas; AN: área del núcleo; m: pendiente; R^2 : coeficiente de determinación; p: probabilidad asociada al evento para $\alpha = 0.05$ (significancia $p < ,05$). Las celdas en blanco indican que no se realizaron registros.

Variables	MEQD/VE/99/Trino						TeAp-Mantecal01					
	Corteza			Médula			Corteza			Médula		
	m	R^2	p	m	R^2	p	m	R^2	p	m	R^2	p
ϕ -REL	0,18	0,96	0,00				0,25	0,97	0,00			
#VA				-0,07	0,95	0,01				-0,07	0,96	0,01
#PM	-0,27	0,89	0,03	-0,22	0,87	0,04	-0,51	0,89	0,01	-0,49	0,87	0,03
APM	0,18	0,72	0,02	0,18	0,92	0,02	0,42	0,87	0,00	0,47	0,94	0,04
#CM/PM	-0,42	0,88	0,00	-0,15	0,93	0,01	-0,45	0,89	0,00	-0,09	0,92	0,03
AIL	0,14	0,90	0,04	0,17	0,95	0,03	0,16	0,97	0,03	0,20	0,94	0,04
#IL	-0,34	0,95	0,02	-0,15	0,93	0,02	-0,51	1,00	0,03	-0,19	0,96	0,04
#RL	-0,27	0,82	0,01	-0,09	0,93	0,01	-0,31	0,83	0,01	-0,10	0,89	0,01
#RRER	-0,07	0,96	0,02	-0,14	0,92	0,02	-0,25	0,90	0,03	-0,08	0,88	0,03
#GLF	0,62	0,89	0,00	0,13	0,94	0,03	0,67	0,85	0,00	0,08	0,93	0,03
#FM	0,09	0,92	0,03	0,14	0,97	0,02	0,17	0,90	0,04	0,11	0,90	0,03
AN	-0,38	0,76	0,02	-0,19	0,89	0,02	-0,42	0,86	0,01	-0,18	0,93	0,01

caballo) en un nuevo espacio 2-dimensional generado por el ADM tras reducir el hiperespacio 12-dimensional original. En la Fig. 7 se aprecia separación evidente entre los grupos control, (A1, A2), MEQD/VE/99/Trino (B1, B2) y TeAp-Mantecal01 (C1, C2). Resulta igualmente obvia la falta de discriminación concluyente entre corteza y médula en los tres grupos experimentales. Los resultados generados por el modelo requieren establecer cuantitativamente la separación entre los centros de simetría (centroides) de las nubes de puntos que aparecen en la Fig. 7.

El estadístico distancia de Mahalanobis (D^2) es una medida de distancia basada en correlaciones entre variables que determina la separación (similitud) entre muestras y no depende de la escala de medición (22). Mientras la magnitud numérica de D^2 sea mayor, también será mayor el alejamiento entre los centroides considerados. Los valores de D^2 avalan con significan-

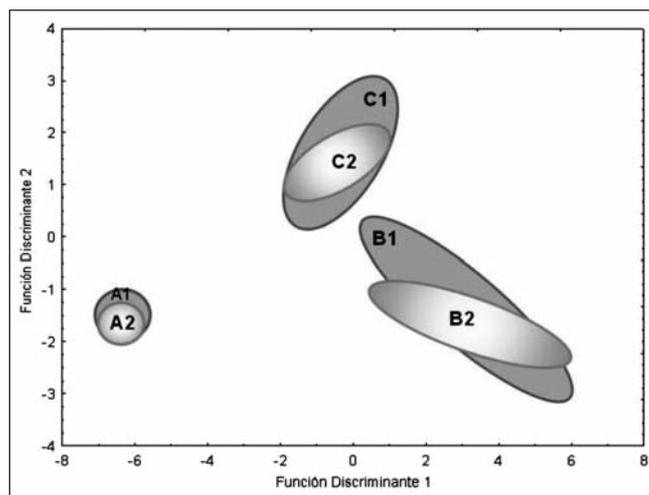


Figura 7. Representación bidimensional de los resultados del Análisis Discriminante Múltiple. A1: variables registradas en la corteza adrenal de ratones control; A2: variables registradas en la médula adrenal de ratones control; B1: variables registradas en la corteza adrenal de ratones infectados experimentalmente con el aislado MEQD/VE/99/Trino; B2: variables registradas en la médula adrenal de ratones infectados experimentalmente con el aislado MEQD/VE/99/Trino; C1: variables registradas en la corteza adrenal de ratones infectados experimentalmente con el aislado TeAp-Mantecal01; C2: variables registradas en la corteza adrenal de ratones infectados experimentalmente con el aislado TeAp-Mantecal01.

cia estadística la segregación proporcionada por el modelo matemático que generó el ADM. En los ratones infectados con el aislado TeAp-Mantecal01 (*T. evansi* proveniente de *E. caballus*) se aprecia solapamiento completo entre corteza y médula mientras que en los controles (A1, A2) y en los ratones inoculados con MEQD/VE/99/Trino (*T. evansi* originario de *E. asinus*) la superposición no es total (Tabla 3).

La robustez del modelo matemático generado por el ADM se basa en los resultados que se muestran en la Tabla 4.

El ADM calcula funciones discriminantes independientes y ortogonales numeradas en orden creciente a partir de 0. Cada función discriminante contribuye menos a la capacidad discriminatoria total que la precedente, siendo el número máximo de funciones estimadas igual al número de grupos estudiados menos uno (23). Según los autovalores, el ADM explicó 85,37% de la variación total del sistema. El R canónico (correlación canónica) estima la variabilidad que existe entre los conjuntos de variables; coeficientes elevados implican adecuada capacidad discriminante, cuanto más cerca de 1, mejor ($0 \leq R^2 \leq 1$)(23). Asimismo, la magnitud numérica de los valores de λ_{WV} representa cuan ajustada se encuentra la función discriminante al grupo de datos al que pertenece y su interpretación es función de su magnitud numérica; $\lambda_{WV} = 0$, implica discriminación perfecta y $\lambda_{WV} = 1$, ausencia de capacidad discriminante, en la medida que λ_{WV} sea menor, mayor será su contribución. La significancia de los valores de λ_{WV} como tales se calcula con base a una transformación de χ^2 . Por último, Las funciones discriminantes 0, 1, y 2 son estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Tabla 4)(23).

DISCUSIÓN

Las disfunciones endocrinas son eventos reseñados en infecciones humanas y animales por tripanosomas (27). Ciertamente, cambios patológicos terminales como insuficiencia adrenal humana y falla endocrina poliglandular animal han sido descritos en infecciones por *T. brucei* (28), así como varios tipos de disfunción endocrina en infecciones caprinas (29), bovinas (30) y de carneros (31) por *T. congolense*, al igual que en toros cebú por *T. vivax* (27). Resultados previos (6) demostraron cambios ultraestructurales en la corteza adrenal de

Tabla 3
Distancias entre grupos. D²: distancia de Mahalanobis; p: probabilidad asociada para $\alpha = 0,05$ con significancia $p < 0,05$; na: no aplica

		Control corteza	Control médula	MEQD/VE/99/Trino corteza	MEQD/VE/99/Trino médula	TeAp-Mantecal01 corteza	TeAP-Mantecal01 médula
Control corteza	D2	—					
	p	na					
Control médula	D2	1,86	—				
	P	0,00	na				
MEQD/VE/99/Trino corteza	D2	234,91	232,99	—			
	P	0,00	0,00	na			
MEQD/VE/99/Trino médula	D2	233,47	232,99	3,02	—		
	P	0,00	0,00	0,04	na		
TeAp-Manteca/01 corteza	D2	103,61	103,46	79,18	79,99	—	
	P	0,00	0,00	0,03	0,02	na	
TeAp-Manteca/01 médula	D2	103,53	103,58	81,60	80,17	0,97	—
	P	0,00	0,00	0,01	0,01	00	na

Tabla 4
Resumen de los resultados del Análisis Discriminante Múltiple. λ_W : lambda de Wilks; χ^2 : chi cuadrado; p: probabilidad asociada al evento para $\alpha = 0,05$ con significancia $p < 0,05$.

Función	Autovalor	R canónico	λ_W	χ^2	p
0	8,699	0,964	0,009	439,609	0,001
1	3,913	0,907	0,030	320,915	0,003
2	1,712	0,697	0,049	118,694	0,004
3	0,256	0,494	0,286	65,941	0,093
4	0,051	0,262	0,782	13,188	0,102

ratones Balb/c infectados experimentalmente con un aislado venezolano de *T. evansi*; en esta ocasión demostramos daño en corteza y médula inducido por dos aislados venezolanos que no habían sido investigados, utilizando además, una vía de inoculación (intradémica) y un inóculo (1 tripanosoma/gr de peso ratón) más parecidos a los naturales (32). Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la infección experimental de ratones NMRI con dos aislados venezolanos de *T. evansi*, uno proveniente de asno (MEQD/VE/99/Trino) y otro de caballo (TeAp-Mantecal01), desencadenaron

cambios submicroscópicos en la corteza y la médula de la glándula adrenal. La comparación de la supervivencia entre ratones infectados (100% mortalidad) y ratones control (0% mortalidad) indica que los cambios ultraestructurales en corteza y médula están vinculados a la infección experimental por *T. evansi*.

Los primeros cambios ultraestructurales se correspondieron con infiltrados (micrografías no mostradas), procesos defensivo-reparadores propios de tejidos vascularizados singularizados por aumento de permeabilidad y migración de células efectoras hacia el foco inflamatorio (33). Las características celulares del infiltrado observado en este trabajo, básicamente macrófagos y linfocitos, se corresponden con los descritos en miopatías metabólicas por deficiencia de vitamina E y selenio (34), por rhabdomiólisis por ejercicio, humana (35) y equina (36, 37), así como tras el uso de moléculas con propiedades inmunoestimulantes como interleuquina 2 e interferón-alfa (38).

Los cambios ultraestructurales incluyeron hinchamiento progresivo de las cisternas del REL en corteza adrenal. Es probable que la degeneración mitocondrial sea la responsable de tal agrandamiento, ya que al comprometer la producción de ATP se modifica el transporte

activo de iones de la membrana celular y la bomba sodio-potasio, liberando en consecuencia Ca^{++} que inhibiría la fosforilación oxidativa, incrementaría la glucólisis anaeróbica y la acumulación de ácido láctico en el citoplasma induciendo descenso en el pH, responsable final del deterioro de las membranas de REL; la cadena de circunstancias afectaría la capacidad de síntesis y producción de enzimas relacionadas con los procesos esteroideogénicos (39). Es probable que esta cascada de eventos perniciosos se deba al efecto citotóxico y mecánico que genera la existencia real del parásito en el interior de las células corticales, presencia que disminuiría la secreción de cortisol y la concentración de aldosterona.

Los cambios submicroscópicos en la médula adrenal comprendieron disminución en el número de vesículas de adrenalina en el interior de las células cromafines, un indicador universal de patología medular de etiología variada (40, 41).

No es sorprendente que ambas regiones adrenales tengan cambios submicroscópicos concomitantes, ya que la respuesta endocrina al estrés se caracteriza por la liberación simultánea de catecolaminas de la médula y glucocorticoides de la corteza; la actividad cortical y medular está sincronizada por interacciones intra-adrenales coordinadas (42).

En ambas regiones adrenales se observó deterioro mitocondrial, condición previamente reportada en corteza adrenal (6) y que, en otros modelos, ha sido asociada a cambios enzimáticos relacionados con el ciclo de Krebs (43).

Los cambios en las características de las inclusiones lipídicas en la glándula adrenal descritos en este trabajo han sido asociados a la síntesis del ADN y relacionados con el envejecimiento celular (44), este hallazgo sugieren que el *T. evansi* interferiría con la progresión de la fase S del ciclo celular de las células adrenales.

A diferencia de lo descrito en células adrenales estresadas (41), nuestras observaciones evidenciaron disminución en el número de ribosomas, libres y adosados a las cisternas del retículo endoplasmático rugoso.

La lipofucsina es un producto intermedio de la peroxidación lipídica con dos componentes, uno lipídico y otro proteico, que se forma en los procesos de autofagia. Se trata de un gránulo que se acumula en el citoplasma

durante el proceso de envejecimiento celular a consecuencia de factores como deficiencias en las enzimas lisosomales para hidrolizar lípidos y otros materiales degradables, aumento en la cantidad de materiales degradables como complejos antígeno-anticuerpo, factores extrínsecos como dieta, drogas, hipoxia, déficit de vitamina E, cirrosis y placas arteriales, así como elementos genéticos que regulan la formación y la actividad de enzimas lisosomales que pueden inducir lesiones celulares (45). La acumulación progresiva de gránulos de lipofucsina en nuestro modelo experimental sugiere que el *T. evansi* aceleraría los procesos naturales de envejecimiento. Singularidades propias de la adultez, aparecen en ratones que al momento de la muerte poblacional contaban con once semanas y tres días de vida en la infección por MEQD/VE/99/Trino y once semanas y un día en la infección por TeAp-Mantecal01, edades distantes de las 120-168 semanas de esperanza de vida de los ratones de laboratorio (13); además, estos cambios no se observaron en los controles de la misma edad.

Las figuras mielínicas son productos de naturaleza lipoproteica asociados a mecanismos de degradación-renovación continua (33) y su acumulación progresiva ha sido relacionada con procesos de senescencia celular por cuanto en condiciones normales son remanentes completamente catabolizados difíciles de observar (46).

Indiferentemente de cual haya sido el aislado infectante, el área del núcleo de las células corticales y medulares disminuyó consistentemente a lo largo del tiempo de experimentación. Esta reducción se corresponde con un proceso de función reducida del metabolismo nuclear, una respuesta celular acomodaticia al estrés producido por lesiones de diversa etiología y, particularmente notoria, en procesos atróficos (47). Sin duda que en este trabajo las lesiones fueron producidas por el *T. evansi*, ya que la reducción de las magnitudes numéricas del área nuclear no fue evidente en los controles.

Ciertamente que los cambios patológicos observados con microscopía electrónica de transmisión en la glándula adrenal, deterioran progresivamente la salud de los ratones infectados, ya que la muerte celular es acompañada por proteólisis severa de la membrana celular y el citoesqueleto con la consecuente liberación de elementos somáticos que, por carecer de control homeostático, se convierten en agentes tóxicos (47).

Las anomalías ultraestructurales observadas en la glándula adrenal de ratones infectados experimentalmente con estos aislados venezolanos de *T. evansi* estarían asociadas a problemas metabólicos, pérdida de la homeostasis del K⁺, y senescencia prematura favoreciendo los procesos que conllevan a la muerte de los animales de experimentación.

En investigaciones previas (6) describimos cambios ultraestructurales cualitativos en la corteza adrenal de ratones Balb/c infectados experimentalmente con un aislado venezolano de *T. evansi* obtenido de caballo, pero no comparamos ni analizamos cuantitativamente las características del daño producido por dos aislados diferentes (MEQD/VE/99/Trino y TeAp-Mantecal01) al utilizado en esa oportunidad en ambas regiones adrenales (corteza y médula).

La tripanosomiasis humana por *T. brucei gambiense* ha sido relacionada con cambios adrenales esporádicos y/o fortuitos referidos como insuficiencia adrenal transitoria (48). Estos hallazgos descontextualizan, en términos de heterogeneidad mórbida, nuestros resultados cualitativos, ya que sugerirían que el daño debido al aislado obtenido de asno (MEQD/VE/99/Trino) no diferiría del ocasionado por el aislado obtenido de caballo (TeAp-Mantecal01) y la magnitud de cualquier diferencia estaría sesgada por la experiencia del observador. En consecuencia, abordamos el estudio de los cambios de la ultraestructura adrenal por *T. evansi* empleando técnicas estadísticas uni- y multivariantes.

El manejo cuantitativo de las magnitudes numéricas de variables morfométricas que expresan aspectos del tamaño y la forma de los organismos (variables homólogas) permite compendiar numérica y gráficamente aspectos de su biología (49). En este contexto, se ha establecido que la heterogeneidad numérica de las variables homólogas puede ser efecto de la localidad geográfica de origen de los organismos, de sus estadios de desarrollo, de los efectos ambientales, de las características genéticas de los especímenes, así como de aspectos de la biología evolutiva y de las relaciones filogenéticas que se establecen entre diferentes razas geográficas, especies y/o subespecies (50, 51). Así, la heterogeneidad numérica de variables submicroscópicas en las células adrenales estaría relacionada con la existencia de agentes etiológicos versátiles que expresarían virulencias diferenciables en el mismo ámbito tisular.

Los resultados del ANOVA sobre las variables ultraestructurales registradas en corteza y médula adrenal, demostraron diferencias significativas en las medias de sus valores numéricos, comprobándose así que las magnitudes de daño submicroscópico, difieren. Más aun, las interacciones Tiempo-Infección, Tiempo-Aislado, Infección-Aislado e Infección-Región adrenal resultaron significativamente diferentes, demostrando de este modo que en el transcurso del tiempo se aprecian diferencias en la infección y el aislado. También se observan diferencias entre el aislado y la región y los controles difieren significativamente de los grupos inoculados con *T. evansi*. El ANOVA demostró que en este modelo experimental que la acción patógena del *T. evansi* deteriora indistintamente tanto corteza como médula.

Estos argumentos ejemplifican la variabilidad patogénica que tienen estos dos aislados de *T. evansi*; heterogeneidad que apoyaría la existencia de poblaciones venezolanas de *T. evansi* que expresarían diferentes capacidades lesivas en la glándula adrenal. De hecho, en este trabajo demostramos que la rapidez de cambio de las magnitudes numéricas de las variables submicroscópicas consideradas, es función del aislado, siendo el deterioro asociado mayor en los animales infectados con el *T. evansi* proveniente de caballo (TeAp-Mantecal01).

Si bien la heterogeneidad morfofuncional de aislados venezolanos de *T. evansi* obtenidos de asno, caballo y chigüire (*Hydrochoerys hydrochaeris*) ha sido investigada con este mismo modelo experimental (14), nada se sabe del análisis cuantitativo de los cambios submicroscópicos inducidos experimentalmente en corteza y médula adrenal. Los resultados presentados son concluyentes y demuestran heterogeneidad mórbida sobre la glándula adrenal de ratones infectados experimentalmente con los aislados locales MEQD/VE/99/Trino y TeAp-Mantecal01 de *T. evansi*.

En estudios previos (52, 53) hemos analizado el cambio ultraestructural hepático y renal en infecciones murinas experimentales por *T. evansi* venezolano con técnicas estadísticas univariadas. En este trabajo, por el contrario, abordamos el estudio del cambio ultraestructural en la glándula adrenal con técnicas multivariantes por cuanto los procesos naturales son acontecimientos complejos que resultan de interacciones multifactoriales.

Las herramientas cuantitativas de simulación matemática han sido utilizadas en diversidad de modelos biológicos (54, 55, 56), y las herramientas multivariantes se han empleado en investigaciones relacionadas con tripanosomas (57, 58, 59). No obstante carecemos de información referente de trabajos que analicen el cambio ultraestructural en infecciones por tripanosomas con criterios multivariantes.

Las distancias de Mahalanobis y el ADM demostraron discriminación entre los cambios registrados en la glándula adrenal de los ratones control y los infectados con *T. evansi*. El análisis demostró discriminación entre el daño ocasionado en la glándula adrenal por el aislado MEQD/VE/99/Trino (obtenido de asno) y el TeAp-Mantecal01 (proveniente de caballo). Sin embargo, no discriminó daño entre corteza y médula en ningún grupo. Por su parte, las distancias de Mahalanobis suministraron información numérica objetiva de la distancia que separa los centroides de las nubes de puntos generadas por el ADM.

El ADM es útil en la discriminación de procesos patogénicos en la glándula adrenal de ratones infectados experimentalmente con dos aislados venezolanos de *T. evansi*. El ADM separó con significancia estadística, las transformaciones submicroscópicas según el asilado que las produjo. Lo concluyente de los resultados del ADM permite conjeturar al respecto de la heterogeneidad mórbida resultante de la infección experimental por tripanosomas de la misma especie que provienen de hábitats diferentes (*E. asinus* y *E. caballus*) y de zonas geográficas distintas (estado Apure y estado Guárico).

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación recibió apoyo financiero de FONACIT (Proyecto G98-03462).

REFERENCIAS

- (1) Hoare CA. *The trypanosomes of mammals. A zoological monograph*. Oxford, Reino Unido: Blackwell Scientific Publications. 1972.
- (2) Reyna Bello A, García FA, Rivera M, Sansó B, Aso PM. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. *Vet. Parasitol.* 1998; 80:149-57.
- (3) García FA, Rivera M, Ortega M, Suárez C. Trypanosomiasis equina causada por *Trypanosoma evansi* en tres hatos ganaderos del estado Apure, Venezuela. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV.* 2001; 41: 91-100.
- (4) Rivera MA. Hemoparasitosis bovinas. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela - Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. 1996.
- (5) Martínez LW. El espacio rural venezolano. *Agraría.* 2006; 70: 69-97.
- (6) Rossi M, Boada Sucre A, Finol HJ, Tejero F, Bello B, Aso P, Hernández G. Ultrastructural alterations in the adrenal gland cortex of mice experimentally infected with a Venezuelan isolate of *Trypanosoma evansi*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 1999; 31: 509-513.
- (7) Parker KL, Rainey WE. *The adrenal glands*. En: Textbook of endocrine physiology. New York, USA: Oxford University Press. 2004, p. 319-348.
- (8) Igbowke IO. Mechanism of celular injury in African Trypanosomiasis. *Vet. Bul.* 1994; 64: 61-62.
- (9) Reincke M, Arlt W, Heppner C, Petzke F, Chrousos GP, Allolio B. Neuroendocrine dysfunction in African trypanosomiasis. The role of cytokines. *Ann. NY Acad. Sci.* 1998; 840: 809-821.
- (10) Ogwu D, Njoku CO, Ogbogu VC. Adrenal and thyroid dysfunctions in experimental *Trypanosoma congolense* infection in cattle. *Vet. Parasitol.* 1992; 42:15-26.
- (11) Zwemer RL, Culbertson JT. Serum potassium level in *Trypanosoma equiperdum* infection in rats: role of potassium in death from this Infection. *Am. J. Hyg.* 1939; 29: 7-12.
- (12) Heppner C, Petzke F, Arlt W, Mbulamberi D, Siekmann L, Vollmer D, Ossendorf M, Winkelmann W, Allolio B, Reincke M. Adrenocortical insufficiency in Rhodesian sleeping sickness is not attributable to suramin. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1995; 89: 65-68.
- (13) Anver MR, Haines DC. 2004. Gerontology. En: The laboratory mouse. London, UK: Elsevier Academic Press. 2004, p. 311-344.
- (14) Tejero F, Roschman González A, Perrone Carmona TM, Aso PM. *Trypanosoma evansi*: A quantitative approach to the understanding of the morphometry-hematology relationship throughout experimental murine infections. *J. Protozool. Res.* 2008; 18:34-47.
- (15) Perrone TM, Gonzatti MI, Villamizar G, Escalante A, Aso PM. Molecular profiles of Venezuelan isolates of *Trypanosoma* sp. by random amplified polymorphic DNA method. *Vet. Parasitol.* 2009; 161: 194-200.
- (16) Schuster JP, Mehlhorn H, Raether W. Ultrastructural changes on various *Trypanosoma* spp. after a 30-year storage period in liquid nitrogen. *Parasitol. Res.* 1996; 82: 720-726.

- (17) Glauert AM. *Fixatives*. En: Practical methods in electron microscopy. New York, USA: American Elsevier. 1974, p. 5-65.
- (18) Millonig G. Study on the factors which influence preservation of fine structure. En: Symposium on electron microscopy. Roma, Italia: Consiglio Nazionale delle Ricerche. 1964, p. 347.
- (19) Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1958; 4: 475-481.
- (20) Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 1963; 17: 208-212.
- (21) Sokal RR, Rohlf FJ. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. New York, USA: W.H. Freeman. 1995.
- (22) Manly BFJ. Multivariate statistical methods: A primer. Boca Raton, USA: Chapman & Hall/CRC. 2005.
- (23) Martínez Arias R. Análisis multivariante en la investigación científica. Madrid, España: La Muralla-Hespérides. 1999.
- (24) Villanueva SO, Hernández GR. Manual de ciencia en animales de laboratorio. México: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición. 2004.
- (25) Hollander M, Wolfe, D. Nonparametric statistical methods. New York, USA: John Wiley and Sons. 1999.
- (26) Conover WJ, Johnson ME, Johnson MM. A comparative study of tests for homogeneity of variances, with applications to the outer continental shelf bidding data. Technometrics. 1981; 23: 351-361.
- (27) Fatihu MY, Adamu S, Ibrahim NDG, Eduvie LO, Esievo KAN. The effect of experimental *Trypanosoma vivax* infection on the thyroid gland in Zebu bulls. Vet. Archiv. 2009; 79: 429-437.
- (28) Reincke M, Arlt W, Heppner C, Petzke F, Chrousos GP, Allolio B. Neuroendocrine dysfunction in African trypanosomiasis. The role of cytokines. Ann. New York Acad. Sci. 1998; 840: 809-821.
- (29) Mutayoba BM, Gombe S, Kaaya GP, Waidi EN. Effect of chronic experimental *Trypanosoma congolense* infection on the ovaries, pituitary, thyroid and adrenal glands in female goats. Res. Vet. Sci. 1988; 44: 140-146.
- (30) Ogwu D, Njoku CN, Ogbogu VC. Adrenal and thyroid dysfunctions in experimental *Trypanosoma congolense* infection in cattle. Vet. Parasitol. 1992; 42: 15-26.
- (31) Mutayoba BM, Eckersall PD, Jeffcoate IA, Cestnik V, Holmes PH. Effects of *Trypanosoma congolense* infection in rams on the pulsatile secretion of L.H. and testosterone and responses to injection of GnRH. J. Reprod. Fertil. 1994; 102: 425-431.
- (32) Foil LD. Tabanids as vectors of disease agents. Parasit. Today. 1989; 5: 88-96.
- (33) Kumar V, Ramzi S, Cotran MD. Basic Pathology. Philadelphia, USA: W.B. Saunders. 1997.
- (34) Fujimoto Y, Madarame H, Yoshida A, Moriguchi R. Light and electron microscopic studies on muscular degeneration in foals. B. Equine Res. Ins. 1986; 23: 14-27.
- (35) Warhol MJ, Siegel AJ, Evans WJ, Silverman LM. Skeletal muscle injury and repair in marathon runners after competition. Am. J. Pathol. 1985; 118: 331-339.
- (36) Lindholm A. Pathophysiology of exercise induced diseases of the musculoskeletal system of the equine athlete. En: Equine exercise physiology 2. Proceedings on equine exercise physiology. Davis, USA: ICEEP Publications. 1987, p. 711-727.
- (37) Sucre L. Rbdomiólisis en el equino: análisis ultraestructural, histoquímico, bioquímico y hematológico. Tesis Doctoral. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina. 1991.
- (38) Tartour E, Schlumberger M, Dorval T, Baudin E, Fridman WH. Endocrine involvement in immunotherapy. Ann. Endocrinol. 1995; 56: 143-148.
- (39) Manna PR, Dyson MT, Stocco DM. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. Mol. Hum. Reprod. 2009; 15: 321-333.
- (40) Fung MM, Viveros OH, O'Connor DT. Diseases of the adrenal medulla. Acta Physiol (Oxf). 2008; 192: 325-335.
- (41) Khan AN, Solomon SS, Childress RD. Composite pheochromocytoma-ganglioneuroma: a rare experiment of nature. Endocr. Pract. 2010; 16:291-929.
- (42) Ehrhart Bornstein M, Bornstein SB. Cross-talk between adrenal medulla and adrenal cortex in stress. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008; 1148: 112-117.
- (43) Benn DE, Gimenez Roqueplo AP, Reilly JR, Bertherat J, Burgess J, Byth K, Croxson M, Dahia PL, Elston M, Gimm O, Henley D, Herman P, Murday V, Niccoli Sire P, Pasiaka JL, Rohmer V, Tucker K, Jeunemaitre X, Marsh DJ, Plouin PF, Robinson BG. Clinical presentation and penetrance of pheochromocytoma/paraganglioma syndromes. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2006; 91: 827-836.
- (44) Ito M. Radioautographic studies on aging change of DNA synthesis and the ultrastructural development of mouse adrenal gland. Cell. Mol. Biol. 1996; 42: 279-292.

- (45) Campisi J. Cellular senescence and cell death. En: Physiological basis of aging and geriatrics. Boca Raton, USA: CRC Press. 2003, p. 47-60.
- (46) Ghadially Feroze N. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. London, UK: Hodder Arnold. 1997.
- (47) Majno G, Joris I. Cells, tissues and disease: Principles of general pathology. New York, USA: Oxford University Press. 2004.
- (48) Blum JA, Schmid C, Hatz C, Kazumba L, Mangoni P, Ruttishauser J, La Torre A, Burri C. Sleeping glands? - The role of endocrine disorders in sleeping sickness (*Trypanosoma brucei gambiense* Human African Trypanosomiasis). Acta Trop. 2007; 104: 16-24.
- (49) Bookstein FL. Foundations of morphometrics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 1982; 13: 451-470.
- (50) Rohlf FJ, Marcus LF. A revolution in morphometrics. Trends Ecol. Evol. 1993; 8: 129-132.
- (51) Adams DC, Funk D. Morphometric inferences on sibling species and sexual dimorphism in *Neoclamisus bebianae* leaf beetles: multivariate applications of the thin-plate spline. Syst. Biol. 1997; 46: 108-194.
- (52) Tejero F, Brun S, Roschman González A, Perrone Carmona TM, AsoP M, Velasco E, Finol HJ. *Trypanosoma evansi*: analysis of the ultrastructural change in hepatic cells during murine experimental infections. Acta Microsc. 2009a; 18: 28-32.
- (53) Tejero F, Brun S, Roschman González A, Velasco E, Aso PM, Finol HJ. Ultraestructura renal en infecciones murinas experimentales con un aislado venezolano de *Trypanosoma evansi*. Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel". 2009; 40 (2): 44-49.
- (54) Sampson PD, Streissguth AP, Bookstein FL, Barr HM. On categorizations in analyses of alcohol teratogenesis. Environ. Health Persp. 2000; 108: 421-428.
- (55) Buckley PF, Dean D, Bookstein FL, Han S, Yerukhimovich M, Min KJ, Singer B. A three-dimensional morphometric study of craniofacial shape in schizophrenia. Am. J. Psychiatry. 2005; 162: 606-608.
- (56) Schaefer K, Bookstein FL. Does geometric morphometrics serve the needs of plasticity research? J. Biosci. 2009; 34: 589-599.
- (57) Rosselli FP, Albuquerque CN, Da Silva AB. A chemometric study of megalol derivatives with activity against *Trypanosoma equiperdum*. SAR QSAR Environ. Res. 2006; 17: 533-547.
- (58) Arboleda S, Gorla DE, Pocasi S, Saldaña A, Calzada J, Jaramillo ON. Development of a geographical distribution model of *Rhodnius pallescens* Barber, 1932 using environmental data recorded by remote sensing. Infect. Genet. Evol. 2009; 9: 441-448.
- (59) Saric J, Li JV, Swann JR, Utzinger J, Calvert G, Nicholson JK, Dirnhofer S, Dallman MJ, Bictash M, Holmes E. Integrated cytokine and metabolic analysis of pathological responses to parasite exposure in rodents. J. Proteome Res. 2010; 9: 2255-2264.