



**UNIVERSIDAD DE CHILE**



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESTUDIO DE LA RESPUESTA LOCAL Y SISTÉMICA  
ASOCIADA AL ESTRÉS PROVOCADO POR LA PICADA DE  
VINCHUCA (*Mepraia spinolai*) EN EL CONEJO EUROPEO  
(*Oryctolagus cuniculus*)

**RODRIGO PASCAL BRAÑES CONCHA**

Memoria para optar al título  
Profesional de Médico Veterinario.  
Departamento de Cs. Biológicas.

Profesor Guía: Dr. Pedro Cattán.  
Proyecto Fondecyt 1040711.

Santiago – Chile  
2008



**UNIVERSIDAD DE CHILE**



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESTUDIO DE LA RESPUESTA LOCAL Y SISTÉMICA  
ASOCIADA AL ESTRÉS PROVOCADO POR LA PICADA DE  
VINCHUCA (*Mepraia Spinolai*) EN EL CONEJO EUROPEO  
(*Oryctolagus cuniculus*)

**RODRIGO PASCAL BRAÑES CONCHA**

Memoria para optar al título  
Profesional de Médico Veterinario.  
Departamento de Cs. Biológicas.

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : PEDRO CATTAN	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: HÉCTOR ALCAÍNO	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: LUIS ALBERTO RAGGI	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**  
2008

## **DEDICATORIA**

Quisiera dedicar este trabajo a mi familia:  
Catarina Castillo, amor mío, por su tesón y apoyo  
incondicional. A mi hijo Nicolás por ser mi fuerza y mi luz.  
A cada uno de los profesores que colaboraron en este  
proyecto con su saber y amistad.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>Informe de aprobación</b>	2
Dedicatoria	3
<b>Resumen</b>	4
<b>Summary</b>	6
<b>I. Introducción</b>	8
<b>II. Revisión Bibliográfica</b>	9
Enfermedad de Chagas	9
La enfermedad de Chagas en el hombre	10
Transmisión de la enfermedad	11
Antecedentes del parásito	12
Antecedentes de la enfermedad de Chagas en Chile	13
El conejo silvestre como reservorio de la enfermedad de Chagas	17
Control de la enfermedad	18
Antecedentes económicos	21
Fisiología del estrés	22
Respuesta del hospedero	28
<b>III. Hipótesis</b>	30
<b>IV. Objetivos</b>	30
<b>V. Material y Método</b>	31
<b>VI. Resultados</b>	
Cortisol plasmático	35
Glicemia	35
Quimioluminiscencia	35
Cutímetro	36
Eritrocitos	36
Leucocitos	36
Heterófilos	37

Linfocitos	37
Eosinófilos	37
Basófilos	38
Monocitos	38
Estadística descriptiva y análisis de la varianza	39
<b>VII. Discusión</b>	<b>43</b>
<b>VIII. Conclusiones</b>	<b>54</b>
<b>IX. Bibliografía</b>	<b>56</b>
<b>Anexos</b>	<b>63</b>

## **RESUMEN**

Existen dos especies de insectos triatominos reconocidos en Chile como vectores de la enfermedad de Chagas, *Triatoma infestans* y *Mepraia spinolai* que a su vez se asocian al ciclo domiciliario y silvestre de la infección, respectivamente. El estudio de los puntos de conexión entre el ciclo silvestre y el ciclo domiciliario de la enfermedad de Chagas, es de gran importancia en el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad. Un posible punto de contacto entre ellos son aquellos mamíferos que ambas especies han seleccionado positivamente como hospedero-presa en los sectores donde coinciden en su distribución y que además son reservorios de la enfermedad. El conejo silvestre es una especie recientemente introducida que satisface estos criterios y que progresivamente ha superpuesto su hábitat con el del hombre y viceversa. Se ha propuesto, entonces, establecer la calidad de hospedero que tendría el conejo silvestre para *M spinolai*, en particular determinando si la picada de vinchuca es percibida y elaborada por el conejo como una condición de estrés agudo, para cuyo efecto fueron determinadas variables endocrinas, metabólicas y celulares pre y post experimentales. Además, se comparó la respuesta sistémica y local causada por una punción con aguja fina con aquella provocada por la picada de vinchuca. Para ello, se dispuso de 9 conejos silvestres de 6 meses de edad, sin distinción de sexo y se formaron aleatoriamente tres grupos de tres individuos cada uno. El grupo 1 fue sometido a la picada de vinchuca, el grupo 2 fue sometido a punción con aguja fina y el grupo 3 correspondió al control. Una vez obtenidos los valores basales para cada individuo dentro de cada grupo, se procedió a realizar mediciones dentro de la primera hora, pasadas 24 horas y 48 horas del manejo experimental.

Las variables estudiadas correspondieron a cortisol plasmático, glicemia, quimioluminiscencia, recuento de eritrocitos, recuento total y diferencial de leucocitos además se midió la respuesta local en el sitio de picada y punción mediante el empleo de cutímetro. Este protocolo fue repetido en dos ocasiones más transcurridos diez días entre ellos. Cada individuo correspondió a su propio control y los datos se analizaron en un ANDEVA para parcelas divididas (tratamientos) de muestras repetidas en el tiempo usando la prueba de Tuckey de manera simultánea para cada grupo, cada etapa y cada tiempo dentro de la etapa respectiva ( $p \leq 0,05$ ).

El grupo sometido a picada de vinchucas presenta variaciones consistentes atribuibles a una respuesta sistémica de estrés para las mediciones de quimioluminiscencia, recuento de eritrocitos y recuento diferencial de leucocitos. Esto nos hace pensar en la crucial importancia del método usado en la toma de muestras, así como también en las condiciones de bienestar animal antes, durante y después del manejo experimental.

El grupo sometido a punción presenta variaciones consistentes atribuibles a una respuesta sistémica de estrés en todas las variables, exceptuando la variable glucosa sanguínea que no evidenció diferencias significativas.

Las variables cortisol plasmático, cutímetro, recuento total de eritrocitos manifiestan valores sin diferencia estadística entre los distintos días de muestreo pese a la importante variabilidad individual detectada por el modelo estadístico, lo que confirma la bondad de dichas variables.

## SUMMARY

There are two species of insects triatomine recognized in Chile as vectors of Chagas disease, *Triatoma infestans* and *Mepraia spinolai* which in turn are associated with the domestic and wild cycle of infection, respectively. The study of the points of connection between both of them is of great importance in the understanding of the epidemiology of the disease. One possible point of contact between them are those mammals that both species have been positively selected as host-dam in the sectors where they coincide in their distribution and also are reservoirs of the disease. The wild rabbit is a newly introduced species that meets these criteria and that gradually overlapped with the habitat of man and vice versa. It has been suggested then establish the quality of accommodation that would have the wild rabbit for *M spinolai*, in particular whether the bite of insect vector is perceived and developed by the rabbit as a condition of acute stress for which purpose were certain endocrine variables, metabolic and cellular pre-and post-pilot. In addition, we compared the local and systemic response caused by a fine-needle puncture as the one caused by the bite of insect vector. This will be available from 9 specimens of wild rabbit 6 months of age, regardless of sex and randomly formed three groups of three individuals each. Group 1 was subjected to the bite of insect vector, group 2 underwent fine-needle puncture and group 3 was the control. Once obtained baseline values for each individual within each group proceeded to take measurements within the first hour, past 24 hours and 48 hours of experimental management.



The variables studied were for plasma cortisol, glucose, chemiluminescence, red blood cell count, total and differential leukocyte, besides the local response was measured at the site of puncture and minced using cutimeter. This protocol was repeated twice more within ten days between them. Each individual was in their own control and data were analyzed in an ANOVA for a split plot (treatment) of samples repeated over time using the test of Tuckey simultaneously for each group, each stage and each time within the respective stage ( $p \leq 0,05$ ).

The group submitted a bite of vinchuca varies consisting attributable to a systemic response to stress measurements of chemiluminescence, red blood cell count and differential leukocyte. This makes us think about the crucial importance of the method used in sampling, as well as animal welfare conditions before, during and after handling pilot.

The group subjected to puncture varies consisting attributable to a systemic response to stress in all variables except the variable blood glucose that showed no significant differences.

The variables plasma cortisol, cutimeter, total red blood cell values manifested without statistical difference among different days of sampling despite the significant individual variability detected by the statistical model, which confirms the goodness of these variables.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, descrita por Carlos Chagas en el año 1909, es endémica de Latinoamérica y se estima que aproximadamente 16 a 18 millones de personas estarían afectadas por el *Trypanosoma cruzi*, parásito unicelular flagelado responsable de la enfermedad. Éste es transmitido al hombre y a otros mamíferos a través de insectos infectados del orden Triatominae, conocidos vulgarmente como vinchucas. En Chile se conocen tres especies de vinchucas, dos de ellas responsables de su transmisión, identificándose un ciclo domiciliario asociado a *Triatoma infestans* y un ciclo silvestre asociado a *Mepraia spinolai*. Hasta hoy se desconoce el rol de *Mepraia gajardoi* en la epidemiología en la enfermedad. En Chile, el área chagásica está comprendida entre zonas rurales y periurbanas de la primera a la sexta regiones, estimándose un número aproximado de población expuesta en unos 850.000 habitantes.

La eficiente y rápida adecuación mostrada por parte de *M. spinolai* hacia el conejo europeo, no obstante la reciente introducción de éste último en nuestro país, genera una línea de investigación orientada hacia el estudio de la respuesta del conejo al ser parasitado por *M. spinolai*. Debido a lo anterior, en el presente trabajo se intentará medir el estrés a corto plazo inducido por la picada de la vinchuca en el conejo europeo, determinando variaciones hematológicas antes y después de la picada, y a la vez, estudiando los cambios en los parámetros de producción de radicales libres y cortisol plasmático como una forma de medición del estrés en el tiempo. Además se medirá de manera local la respuesta inflamatoria generada por la picada del insecto.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Enfermedad de Chagas

Los triatomíneos corresponden a una subfamilia de hemípteros conocidos como vinchucas (“el que se nos deja caer” -del quechua-) pertenecientes a la familia Reduviidae, los que se caracterizan por sus hábitos alimenticios estrictamente hematófagos. Estos insectos se encuentran ampliamente difundidos en América y son reconocidos como vectores de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, cuyo agente etiológico es el parásito protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi* (Schofield, 1994). La enfermedad fue descubierta por el investigador Carlos Chagas en 1909 en Brasil, pero existen evidencias paleoparasitológicas que sugieren que la enfermedad apareció en ciertas regiones andinas. La domiciliación de los triatomíneos y la transmisión al hombre surge en épocas precolombinas puesto que la infección ha sido detectada en momias chilenas al interior de la provincia de Tarapacá cuya data se remonta a 2000 años atrás. El territorio en que prevalece la enfermedad se extiende desde el sur de los Estados Unidos, en el paralelo 35 latitud Norte, hasta Chile y Argentina. En Chile, el límite Sur de la zona endémica está en el paralelo 34,5 latitud Sur, en la parte central del país y por Argentina avanza hasta el paralelo 45 latitud Sur (Apt y Reyes, 1990).

Los vectores más importantes de América del Sur son: *Panstrongylus megistus*, *Triatoma sordida*, *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensi*, *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* (Soulsby, 1988). En los países del extremo sur de América del Sur, es decir en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay, el principal vector de la enfermedad de Chagas es el *T. infestans* que tiene hábitos exclusivamente domiciliarios, es decir, coloniza el interior y el peridomicilio de las viviendas humanas (Moncayo, 1999).

## La enfermedad de Chagas en el hombre

Esta enfermedad puede tener un origen congénito o adquirido. En la forma adquirida es transmitida al hombre y otros mamíferos a través de heces de vinchucas contaminadas con el protozoo, infección transfusional y/o trasplantes de órganos (Apt y Reyes, 1990). Presenta tres fases clínicas: aguda, latente y crónica. Entre 30 a 40% de los infectados progresan a la etapa crónica de la enfermedad y 5 a 20 años después de haber adquirido la infección, desarrollan enfermedad cardiovascular o síndrome de megavisceras. Esta etapa se manifiesta durante el período más productivo de la vida, es decir, entre los 35 y 55 años de edad (Vallejo y Reyes, 1996).

La forma de contagio transplacentaria es la infección producida por el paso del protozoo a través de la placenta de una madre infectada al feto. Estudios en Latinoamérica, han demostrado inicialmente que la prevalencia en embarazadas oscila entre 2 y 50%, cifras que en la actualidad han disminuido a 0,5 y 12% lo cual demuestra el impacto del programa de control vectorial en la población general (World Health Organization, 2002). Se ha llegado a establecer que en Chile, la mayor parte de los casos de infección transplacentaria son asintomáticos al nacer y que el diagnóstico precoz de la infección es fundamental pues permite un tratamiento oportuno y eficaz (Lorca y col., 2001a). La forma de presentación clínica de la enfermedad de Chagas congénita es un hecho interesante de analizar en Chile. Hace algunos años la frecuencia de casos sintomáticos con cuadros severos de hepatomegalia, esplenomegalia, ictericia, anemia, trombocitopenia (signos de infección transplacentaria TORCH), de bajo peso al nacer y prematurez era alta, pero en la medida que ha pasado el tiempo y ha disminuido probablemente la exposición de las madres al parásito, la forma de presentación clínica en los niños es asintomática en el 90% de los casos (Muñoz y col., 1992; Lorca, 2001).

### Transmisión de la enfermedad

En condiciones naturales, *T. cruzi* es transmitido por estos chinches ocurriendo su desarrollo en la porción intestinal posterior del insecto. Los tripanosomas metacíclicos pasan a las heces de las chinches parasitadas a los 8 a 10 o incluso más días del comienzo de la infección. El hospedero humano o mamífero se infecta cuando las heces que albergan a los tripanosomas metacíclicos son autoinoculadas por éste al rascarse la picada producida por el insecto, por medio de otras lesiones en piel o membranas mucosas (Soulsby, 1988).

Las vinchucas suelen defecar después de alimentarse y frecuentemente se alimentan en la piel fina próxima a los ojos y a los labios. Los signos de puerta de entrada o chagomas de inoculación, son las lesiones cutáneas más frecuentes en la cara y extremidades. Muy típico es el de la región ocular llamado signo de Romaña-Mazza, que se presenta como edema bpalpebral, unilateral, de color rosado violáceo, claro, indoloro y duro. Los chagomas pueden presentarse en cualquier parte de la piel, son lesiones de aspecto furunculoídeo de color rosado- violáceo e indurados, de duración variable pudiendo llegar a durar hasta 15 días (Apt y col., 2006).

Tras la contaminación de una herida con tripanosomas metacíclicos, ellos penetran en los histiocitos de la zona y proliferan como formas amastigote. Se produce una reacción inflamatoria local y más tarde hay una encapsulación por tejido fibroso, que determina el bloqueo de los vasos linfáticos locales y la producción de edema en la zona implicada. Esta es la lesión primaria conocida como “chagoma”. Los amastigotes pasan de la primera localización a los linfonódulos más próximos y después, a través del sistema linfático, se distribuyen por todo el cuerpo. Hígado, pulmones, bazo, médula ósea, músculo cardíaco y cerebro son los órganos más afectados. En estos órganos los parásitos se multiplican como amastigotes. En la ruptura de células hospederas se liberan formas trypomastigote que

pasan a la sangre, asociándose el proceso con la aparición de fiebre. Las formas amastigote se localizan en pseudoquistes dentro de la célula hospedera y al romperse estas unidades los tripanosomas invaden nuevas células continuando el proceso (Soulby, 1988).

### Antecedentes del parásito

El *T. cruzi* es un protozoo flagelado, que presenta una alta variabilidad. Mediante técnicas de electroforesis e isoenzimas se han podido establecer varios zimodemas con características biológicas y patológicas particulares, que le dan un carácter propio a la enfermedad de Chagas en las diferentes regiones donde es prevalente. De igual forma, el análisis de ADN ha podido revelar la existencia de ezquizodemas, que al igual que los zimodemas se pueden asociar con comportamientos biológicos particulares de los parásitos. En un estudio, mediante la investigación de las características biológicas como virulencia, la evolución de la parasitemia, el histotropismo y las formas celulares predominantes, se pudo diferenciar hasta tres grandes grupos de cepas de *T. cruzi* denominados biodemas. Actualmente se diferencian dos linajes de *T. cruzi* denominados TC1 y TC2. El TC1 corresponde al ciclo silvestre y a casos humanos del altiplano chileno-boliviano y de algunos casos de Venezuela. TC2 corresponde al ciclo doméstico y se divide en 5 sub-grupos: a, b, c, d y e. Esta clasificación se basa en los DUT (Discrete Unit of Typification). La heterogeneidad biológica ha sido observada a nivel de cepas o aislamientos y algunos trabajos han abierto la posibilidad de considerar un comportamiento diferenciado entre los clones constitutivos con respecto a su cepa parental (Apt y col., 2006).

Algunos estudios de polimorfismo enzimático indican que la mayor parte de las cepas de *T. cruzi* se pueden clasificar en tres grupos de zimodemas denominados Z1, Z2 y Z3, cada uno de los cuales parece haber estado relacionado originariamente con diferentes

especies mamíferas y de ahí con la especie de triatomino más comúnmente asociada a esos mamíferos. El zimodema Z1 (más importante en el ciclo silvestre), es el más difundido y parece estar asociado primitivamente con las zarigueyas (*Didelphis spp*) y con la amplia gama de especies triatominas que colonizan las madrigueras de estos animales. Por contraste, el zimodema Z2 se conoce sólo en la región al sur del Amazonas y parece estar asociado primitivamente con los cuyes (*Cavia spp*) y con *T. infestans* que al principio habitaba los nidos de los cuyes en Bolivia. En humanos, tanto el Z1 como el Z2 pueden causar lesiones cardíacas semejantes, pero el Z1 no está asociado con las lesiones intestinales graves que a menudo caracterizan también la infección con el Z2. El tercer grupo de zimodemas Z3, parece estar particularmente asociado a los armadillos (*Dasybus spp*) y los triatominos habitando sus madrigueras (particularmente las especies de *Panstrongylus*), pero raras veces se ha aislado de casos humanos de enfermedad de Chagas (Schofield, 1994).

#### Antecedentes de la enfermedad de Chagas en Chile

En el año 1999, se certificó en Chile la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas cuyo principal responsable de la transmisión del protozoo es *T. infestans*, responsable del ciclo doméstico o antrópico (Zulantay y col., 2004). Por otro lado la vinchuca silvestre, *M. spinolai*, es el vector responsable del ciclo silvestre (ciclo zoótico) de la enfermedad de Chagas sobre el cual se han realizado varios estudios para conocer sus aspectos biológicos y ecológicos (Apt y Reyes, 1990). Dentro de los objetivos de investigación para la década 2000-2010 por la OMS, destaca el estudio de los puntos de conexión entre el ciclo silvestre y el ciclo doméstico de la infección (World Health Organization, 2002).

En el año 2001, se estudió la dieta de *M. spinolai* en canteras de Colina, encontrándose una asociación estrecha entre el conejo europeo (*O. cuniculus*) y la vinchuca silvestre. Se detectó un 4,6% de insectos alimentándose de humanos, 33,0% de conejos y un 6,2% de roedores. Esta gran abundancia relativa del conejo silvestre como presa de *M. spinolai*, transforma a este mamífero en un importante reservorio dentro del ciclo silvestre de *T. cruzi*. Por esta razón, es posible considerar la abundancia relativa de un hospedero como un indicador de importancia epidemiológica. Además, los antecedentes indican que el nicho ecológico de *M. spinolai* es cerca de 2 veces el de *T. infestans*, lo que sugiere que el vector del ciclo silvestre puede llegar a ser de gran importancia epidemiológica, considerando que el éxito del programa de control para *T. infestans* implica prácticamente la desaparición de este vector de los asentamientos humanos (Canals y col., 2001). En un trabajo realizado en el norte del país, se recolectaron desde un mismo ecotopo, ejemplares de *M. spinolai* de diferente estadio. En el sitio de captura, *M. spinolai* se alimenta básicamente de pequeños mamíferos tales como el introducido conejo silvestre (*O. cuniculus*) y roedores nativos como el degu (*Octodon degus*). El contenido intestinal de 182 ejemplares de *M. spinolai* fue extraído y estudiado para la detección del parásito móvil *T. cruzi*. Durante la microscopía directa se detectó que el 9,89% de las ninfas se hallaba infectada con *T. cruzi*, mientras que con el uso de PCR se detectó infección en el 46,15% de ellas lo que confirmó la idea de una posible subestimación de los niveles de infección al usar métodos rutinarios. Más aún, la microscopía directa evidenció una importante subestimación en los estados ninfales jóvenes observados (estadios I y II principalmente) restando valor e importancia de dichos estadios en la transmisión de la enfermedad. El estudio de los niveles de infección por *T. cruzi* en sus vectores naturales adquiere una importancia radical en el control de esta enfermedad. En las distintas áreas endémicas de



Chile han sido informados niveles relativamente bajos de infección y además, las especies de vectores silvestres no han sido objeto de gran atención. Si bien es cierto que el principal vector de la enfermedad de Chagas en Chile, *T. infestans*, ha sido virtualmente eliminado, la potencial importancia de *M. spinolai* en la transmisión de *T. cruzi* no debe ser ignorada (Botto-Mahan y col., 2005).

Aunque ambas especies poseen sistemas de orientación hacia su presa, basados en sensaciones térmicas similares, las respuestas específicas son diferentes. El volumen de sangre ingerido es inversamente proporcional al grado de irritabilidad mostrado por el hospedero. El volumen ingerido durante la picada está en inversa relación al peso del insecto antes de alimentarse y en directa relación al tiempo transcurrido entre picada y picada. Estos hallazgos concuerdan con los observados por Friend y Smith (1977), quienes notaron que el período entre picadas y el grado de distensión abdominal determinan el volumen de sangre ingerido al alimentarse. La frecuencia de picada fue, en ambas especies, menor a 15 días siendo esto lo esperado según anteriores reportes (Cabello y col., 1988). En *M. spinolai* se observó un comportamiento predatorio agresivo iniciando rápidamente el proceso de alimentación y utilizando un lapso de tiempo corto en la picada (9,68 minutos promedio). Los mayores tiempos promedios se han registrado en otras especies de vinchucas, con 21 minutos promedio para *T. infestans* (Zeledón y Rabinovich, 1981).

Es notable el hecho de que *M. spinolai* defecó sobre el ratón en sólo una de 27 ocasiones (3,7%), si lo comparamos con *T. infestans* que lo hizo todo el tiempo. Además, *M. spinolai* demostró una conducta de huida luego de un corto tiempo de alimentación y su tiempo de defecación fue bastante largo en comparación a *T. infestans*. Estas diferencias sugieren que *M. spinolai* podría ser menos eficiente en la transmisión de *T. cruzi* (Canals y col., 1993).

Este hallazgo junto con la baja capacidad de colonización de asentamientos humanos mostrada por *M. spinolai* puede ayudar a explicar su bajo impacto epidemiológico y la menor prevalencia del zimodema 1 (Z1) en pacientes con la enfermedad de Chagas (Canals y col., 1999).

No obstante lo anterior, la dinámica de la transmisión de la enfermedad de Chagas exige un estudio acabado de su epidemiología y en particular de las características de los nichos ecológicos de las diferentes especies reservorios y de insectos triatominos, con el fin de conocer las variables implícitas en la infección natural y así poder diseñar normativas específicas y técnicamente compatibles a la realidad de cada área ecogeográfica comprometida (Angulo, 2000; Ramsey y col., 2000; Botto-Mahan y col., 2005).

Además, se cuenta con información que revela otro aspecto epidemiológico de suma importancia derivado de los programas de control del vector y mejoramiento de la vivienda rural, como es el hecho de que la persistencia del parásito en condiciones post terapia, no está relacionada con la presencia de *T. infestans* (Zulantay y col., 2004).

De la condición epidemiológica silvestre o peridomiciliaria y de un posible solapamiento entre los ciclos domiciliario y silvestre de la enfermedad, se desprende que el conejo silvestre puede ser un posible, pero importante nexo entre los ciclos de la enfermedad, considerando además, la alta frecuencia con que es cazado, la frecuencia con que es usado en crianza doméstica y su hábito de invadir zonas de actividad agrícola (Apt y Reyes, 1990; Canals y col., 2001).

### El conejo silvestre como reservorio de la enfermedad de Chagas

La asociación de *M. spinolai* con lepóridos es novedosa desde varios puntos de vista, en especial epidemiológico y co-evolutivo. Además de los reportes en Chile, existe un antecedente más de lepóridos introducidos en Venezuela como reservorios de *T. cruzi* (Apt y Reyes, 1990). El conejo es una especie introducida en Chile de manera reciente (no más de 150 años) y se ha transformado en un elemento de la fauna propio de los diversos ecosistemas distribuidos desde la IV a la X región, por otro lado, este mamífero es usado de manera frecuente para crianza a nivel casero en sectores rurales (Jaksic y Fuentes, 1980).

Tales hallazgos hacen del conejo un vertebrado de alto interés desde el punto de vista epidemiológico de la enfermedad de Chagas. En definitiva, dados los antecedentes sobre la alta prevalencia de sangre de conejo detectada en vinchucas silvestres (Canals y col., 2001), junto con los datos de laboratorio que evidencian que el conejo mejora los índices de población y fecundidad de estos insectos (Acuña, 2001), se propone que *M. spinolai* ha incorporado como hospedero al conejo europeo seleccionándolo positivamente en los sectores donde coinciden en su distribución. Existen evidencias que permiten pensar que el conejo presenta menor reactividad frente a la picada del insecto, al compararlo con la respuesta de evitación que desarrollan los roedores autóctonos los cuales han tenido un tiempo de interacción con el hematófago mucho más prolongado (Canals y col., 2001).

## Control de la enfermedad

Los estudios realizados muestran que la prevalencia de la enfermedad de Chagas en embarazadas ha disminuido ostensiblemente a más del 56% en comparación a estudios previos realizados en Chile. La incidencia de la transmisión transplacentaria alcanzó un 21,2 % total. Debido a que los niños infectados han sido totalmente asintomáticos, se hace necesario el estudio sistemático de todo recién nacido de madre chagásica para poder pesquisar en forma oportuna la transmisión transplacentaria, sin buscar estigmas o sintomatología sugerente a la infección transplacentaria (García y col., 2001; Lorca y col., 2001b).

En las áreas endémicas de la enfermedad, se ha estimado que el número de personas expuestas al riesgo de infección alcanza aproximadamente los 850.000 individuos, que corresponde al 77% de la población total del país, con unas 142.000 personas infectadas por *T. cruzi*, las cuales se distribuyen en 165 localidades dentro de la región endémica del país, esto es desde la I a la VI regiones, incluyendo la Región Metropolitana (Lorca y col., 2001b; Apt y col., 2006). Si bien las tasas de morbilidad han descendido en el último tiempo, ha habido períodos de ascenso de ella, desde una tasa de 3,22 en el año 1994 a 5,21 para el año 2000, posteriormente se evidencia un descenso sostenido. Desde 1989 no se registran muertes en menores de 15 años y 56% de los casos corresponden al Servicio de Salud Coquimbo. En relación a las tasas de letalidad, éstas han sufrido un incremento significativo que va desde el 62,3 para el año 1990 a 245,83 en el 2004, alcanzando su mayor ascenso en el año 2003, con una tasa de 290 decesos por esta causa. Se ratifica la existencia de una sub-notificación de la infección que estaría en ascenso (Apt y col., 2006).

La Región Metropolitana presentó una menor reducción en el índice de prevalencia de 1,4% a 0,6%, que representa 57,1% de reducción, lo que podría indicar que el programa de control de Chagas no fue tan exitoso aquí al compararlo con otras regiones del área endémica del país. La reducción del número de viviendas infectadas con *T. infestans* a tenido un impacto directo en la prevalencia de la infección causada por *T. cruzi*, tal como lo demuestran los datos obtenidos en la I, II y VI regiones donde la reducción de los casos positivos en niños menores de 5 años ha sido clara. Sin embargo, en el grupo de niños de entre 6 a 10 años, los casos positivos fueron significativamente más altos en las tres regiones estudiadas (I, II y VI) (Lorca y col., 2001b).

Se postula entonces que, en los últimos 5 años, la fumigación de las viviendas con insecticidas y la vigilancia epidemiológica ha reducido de manera significativa la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas. Además, en los últimos 10 años se ha llevado a cabo un lento, pero sostenido plan de mejoramiento en las viviendas y en la calidad de vida de los habitantes de las áreas rurales de Chile. Sin embargo, cada región muestra un pequeño nivel de infección y se evidencia además que en las regiones IV, V y Metropolitana la prevalencia se ha mantenido aproximadamente igual (Lorca y col., 2001b).

Del análisis de los datos se desprende que la vigilancia sero-epidemiológica es una herramienta adecuada en la identificación de las áreas geográficas donde está presente la infección por *T. cruzi*, así como también, para establecer las zonas en las que se ha logrado reducir la presencia o se ha eliminado *T. infestans*. Ambos parámetros entregan valiosa información respecto de la efectividad de los programas diseñados con el fin de reducir o eliminar la población del vector (Lorca y col., 2001b). La interrupción del ciclo doméstico de la transmisión de *T. cruzi* ha sido realizada a través de la puesta en marcha de un programa que involucra educación sanitaria, mejoramiento de la vivienda y la eliminación

del vector con el uso sistemático fumigaciones con insecticidas. Mientras se espera que mejore la calidad de vida de la población, único modo de lograr un real y eficiente control, se deben efectuar campañas educativas y de desinsectación. Es necesario recordar que siempre se logrará un mayor rendimiento epidemiológico en una comunidad previamente informada que ayude activamente a la campaña antichagásica. En las zonas endémicas se debe efectuar a toda embarazada una pesquisa serológica de enfermedad de Chagas. Si ésta fuese positiva, el neonato deberá recibir tratamiento. Del mismo modo, a toda persona donante de sangre se le debe pesquisar enfermedad de Chagas y someterla a tratamiento antes de ser trasfundida. Si esta profilaxis no se puede efectuar, la sangre debe ser desechada. Estas medidas están encaminadas sólo hacia el control y no la erradicación de la enfermedad de Chagas, que es muy difícil por las interrelaciones entre el ciclo doméstico y el silvestre que pueden establecerse por distintos caminos: adaptación de vectores silvestres al ambiente doméstico, por reservorios domésticos conectados o por invasión humana de zonas donde existe el vector silvestre (Apt y Reyes, 1990).

En 1991, los Ministerios de Salud de los países del extremo sur de América del Sur (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay), lanzaron un gran proyecto multinacional, que se conoce como la Iniciativa del Cono Sur- para eliminar la transmisión vectorial de la enfermedad en sus respectivos países. En esta extensa región viven 164 millones de personas y existen 11 millones de infectados por el parásito causal. Es decir, esta región abarca el 70% de la prevalencia e incidencia de la infección humana por *T. cruzi*. Este programa multinacional viene trabajando mancomunadamente desde 1992 y refleja el compromiso político de los gobiernos de estos países para lograr las metas propuestas. Hasta el momento se han invertido más de 303 millones de dólares en insumos y gastos operativos de las actividades de la Iniciativa (Moncayo, 1999).

### Antecedentes económicos

La enfermedad de Chagas es la enfermedad parasitaria de mayor importancia en América Latina, tanto por su morbi-mortalidad como por su impacto económico. Por sí sola supera todas las otras enfermedades parasitarias y se ubica como la tercera enfermedad infecciosa de importancia en la región después del SIDA y la tuberculosis (World Health Organization, 2000). Un informe reciente del Banco Mundial, indica que la enfermedad de Chagas, es la cuarta causa de pérdida económica debida a la morbilidad en América Latina, cuando se mide en años de vida perdidos por discapacidad (AVADS). La preceden únicamente las enfermedades respiratorias agudas, las enfermedades diarreicas y el SIDA/VIH. Anualmente se pierden 3,1 millones de hombre/ año de actividad económica. Se calcula que un 25% de los 484 millones de habitantes de América Latina, están en riesgo de contraer la enfermedad de Chagas. Estudios de prevalencia epidemiológica adelantados en la década 1980-1990, mostraron que existen en el continente 16 millones de personas infectadas por el parásito y que cerca de un 25% de ellas desarrollarán lesiones cardíacas crónicas y digestivas irreversibles. La carga económica principal por la enfermedad de Chagas ocurre en los casos crónicos (Moncayo, 1999; Ramsey y col., 2003).

## Fisiología del estrés

Los eventos inesperados o desconocidos de la vida crean una historia de alerta, que provocan como resultado distintos cambios en el estado endocrino y metabólico de un organismo (Wingfield y Ramenofsky, 1999). Existe un interés creciente en diferentes tópicos que dicen relación con el bienestar animal, no sólo en ciencia sino también como una discusión mantenida en el ámbito público. Un posible indicador de bienestar animal es la ausencia de estrés, pero no existe una definición estándar para este término ni tampoco una prueba bioquímica única que pueda medirlo. Por lo tanto, se necesitan parámetros bioquímicos adicionales para poder detectar tales disturbios. La nomenclatura usualmente utilizada se refiere a estímulo que provoca un desbalance en la homeostasis como estresor y a la correspondiente reacción de defensa generada por un animal como respuesta al estrés (Balm, 1999; Möst y Palme, 2002). Diversas hormonas están involucradas en la respuesta de estrés, tales como: adrenocorticotropina, glucocorticoides, catecolaminas, prolactina y las glándulas adrenales juegan un rol fundamental en las reacciones hormonales al estrés toda vez que ellas involucran tanto al eje hipotálamo-pituitaria-corteza adrenal como al sistema simpático-médula adrenal (Moberg y Mench, 2000).

Diversas situaciones adversas generan respuestas por parte de las glándulas adrenales, que redundan en un incremento en la secreción tanto de glucocorticoides como de catecolaminas. Dichos incrementos constituyen la principal línea de mecanismos endocrinos destinados a defender al organismo de una condición estresora dada. Como otros eventos fisiológicos, el estrés no es perjudicial por sí mismo (Moberg y Mench, 2000; McLean y Smith, 2001). Durante el estrés de corto plazo, los glucocorticoides provocan un aumento en el rendimiento a través de la movilización de energía y pueden también causar cambios conductuales (Korte y col., 1993).



Sin embargo, un estrés crónico severo, esto es alta concentración de cortisol por períodos prolongados de tiempo, puede disminuir el rendimiento de los individuos por inmunosupresión y atrofia de algunos tejidos (Munck y col., 1984). La concentración de cortisol plasmático es ampliamente usada como indicador de estrés, aunque con ciertas precauciones porque no siempre se observan aumentos en su concentración ante los distintos estresores (Broom y Johnson, 1993). Al igual que muchas otras hormonas, los glucocorticoides presentan variación en su liberación de acuerdo al ritmo circadiano de la especie en cuestión. Por lo tanto, la ritmicidad y los episodios de secreción demandan un muestreo de mayor frecuencia (Möst y Palme, 2002). Sin duda es relevante el método usado en la toma de muestras, la que implica la manipulación y/o el confinamiento de los animales, hecho que puede por sí mismo generar una respuesta de estrés y llevar consecuentemente a error en los resultados (Cook y col., 2000). La respuesta frente a estresores requiere de una progresión de eventos que comienza con la percepción y señalización que ocurre por la existencia de diversos mecanismos biológicos presentes con ese fin, luego de ello continúa la activación de mecanismos neurofisiológicos destinados a resistir y prevenir un daño aún mayor (Ewing y col., 1999). Los diferentes receptores sensitivos no sólo reciben la información sino que además, transforman dicha información en señales nerviosas que son transmitidas tanto a centros cognitivos como no cognitivos del sistema nervioso para generar una respuesta coordinada ante el desafío. Se desarrolla entonces, una estrecha interacción entre el sistema nervioso central, sistema inmune y el sistema endocrino respondiendo al estímulo estresor de manera coordinada y afectando la conducta del animal (Axelrod y Reisine, 1984; DeSouza, 1993; Porges, 1995).

La secreción de catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) desde la médula adrenal es característica en las reacciones de huida y lucha preparando al cuerpo para una respuesta activa ante el estresor por ejemplo, generando un aumento en la frecuencia cardíaca y en la presión sanguínea. (Koolhaas y col., 1999).

Los receptores para la hormona liberadora de corticotropina (CRH) han sido identificados en variadas regiones cerebrales incluyendo áreas involucradas en la función cognitiva, como ciertas áreas del sistema límbico que está relacionado con las emociones (DeSouza y col., 1991). El sistema límbico del cerebro incluye estructuras tales como el hipotálamo, núcleos del tálamo, amígdala e hipocampo. Diversos estudios han confirmado que los estímulos impredecibles o incontrolables activan la vía del hipocampo y al eje hipotálamo-pituitaria- adrenal (HPA) causando una depresión de la conducta. La habilidad de adaptarse frente algunos estresores parece estar bajo el control de la amígdala por medio de la activación del sistema nervioso simpático y prepara al animal para la respuesta de huida y lucha (Von Borell, 2001).

La respuesta biológica que ocurre cuando un individuo percibe alguna amenaza a su homeostasis es definida como *estrés*, el que presenta tres aspectos de interés: 1) reconocimiento del factor estresante, 2) defensa biológica y 3) las consecuencias de la respuesta a este estrés. Amplios estudios demuestran que se produce una neutrofilia fisiológica o pseudoneutrofilia en condiciones de excitación, miedo, ejercicio muscular, posprandial o frente a cualquier estado que produzca la liberación de catecolaminas (epinefrina y norepinefrina). Por otro lado, puede ocurrir neutrofilia debido a estrés sistémico de origen no inflamatorio producido por la liberación endógena de glucocorticoides en estados de dolor, trauma, intervenciones quirúrgicas, así como también, por la administración de corticoides exógenos (Moberg y Mench, 2000).

Los corticoides aumentan la liberación de neutrófilos desde el compartimiento de reserva de la médula ósea hacia la circulación, y por otra parte, disminuyen la adherencia y marginación de los neutrófilos al endotelio vascular disminuyendo la salida de estas células a los tejidos. Esta neutrofilia va acompañada de linfopenia, eosinopenia y monocitosis o monocitopenia dependiendo de la especie y el mecanismo de producción (Rudolph y Villouta, 2002). Además, los corticoides reducen la actividad de explosión respiratoria en células polimorfonucleares (Hoeben y col, 1998). El metabolismo del oxígeno es la ruta más eficiente en la producción de energía para la célula (Sallmann, 2004). Como consecuencia de este proceso, la mayor parte del oxígeno disponible reacciona aceptando un electrón y formando moléculas de agua. Sin embargo, entre el 2% a 5% de éste escapa de esta reducción bivalente y realiza aquella monovalente cuyo producto es la formación del radical libre (RL) anión superóxido ( $O_2^-$ ) (Babior, 2000).

Se consideran radicales libres aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera alta inestabilidad y reactividad. Con una vida media efímera, los RL cuentan con una enorme capacidad de combinarse inespecíficamente, en la mayoría de los casos, con diversas moléculas integrantes de la célula: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Halliwell y Gutteridge, 1989). Se agrupa bajo la denominación de especies reactivas derivadas del oxígeno (EROS) a radicales libres y a compuestos estables derivados de óxido-reducción, que además sirven como fuente para la generación de RL (Chihuailaf y col., 2002; Spletistoesser y Shulff-Werner, 2002).

Las células polimorfonucleares poseen una compleja maquinaria que produce y secreta EROS activamente, la cual representa la principal herramienta de defensa frente a la invasión de microorganismos patógenos (Clark, 1990; Babior, 1999). En efecto, los mecanismos de defensa de los fagocitos son quimiotaxis, fagocitosis, degranulación y emisión de EROS (Sliver y Moldow, 1995). La propiedad germinicida que poseen dichas células defensivas, la realizan a través de la degranulación de proteínas y polipéptidos antimicrobianos y mediante la emisión de anión superóxido en un proceso denominado Estallido Respiratorio (ER) (Sibille y Reynolds, 1990; Spletistoesser y Shulff-Werner, 2002). Tras unos cuantos segundos después de haberse unido a una partícula, los neutrófilos incrementan su consumo de oxígeno en casi 100 veces. Este incremento es el resultado de la activación de una enzima de superficie celular llamada NADPH-oxidasa. Ella corresponde a una enzima compleja y multicomponente que forma una cadena de transporte de electrones transmembranal, en donde el NADPH citosólico actúa como donador de electrones, mientras que el oxígeno lo hace como receptor de electrones (Tizard, 1995). Los leucocitos poseen en sus membranas la enzima NADPH-oxidasa generadora de  $O_2$  que en presencia de hierro se transforma en el altamente tóxico ión hidróxido ( $OH^\cdot$ ). Esta situación se da particularmente en los procesos inflamatorios (Market y col., 1984).

Se puede apreciar, por lo tanto, que los RL se forman en condiciones fisiológicas en proporciones controlables por los mecanismos defensivos celulares. En situación patológica esta producción se incrementa, llegando al estado de estrés oxidativo, por lo cual se debe contar con una batería múltiple de defensa contra los diversos RL de oxígeno, que por un lado tiendan a impedir su formación y por otro, los neutralicen una vez formados. Para ello se dispone de complejos enzimáticos tales como: sistema citocromo-oxidasa mitocondrial, sistema superóxido-dismutasa, catalasas, glutatión-peroxidasa, etc (Rodríguez y col., 2001).

El estallido respiratorio se ha definido como la capacidad de los leucocitos para producir radicales libres (McLaren y col., 2003), este mecanismo representa la principal herramienta de defensa celular frente a la invasión de microorganismos patógenos (Clark, 1990; Babior, 1999). De allí surge la creciente importancia del desarrollo de metodologías destinadas a la medición ya sea de la producción o de la liberación de productos del estallido respiratorio de neutrófilos. Dentro de los métodos más usados se encuentran: la amplificación de quimioluminiscencia mediante luminol e isoluminol y reducción de citocromo C (Dahlgren y Karlsson, 1999). Los distintos métodos para la medición de la respuesta al estrés en animales son valiosas herramientas en distintas áreas de la biología. Después de un evento estresante es posible medir la capacidad de los leucocitos circulantes para producir el estallido respiratorio in vitro en respuesta a la estimulación causada por acetato forbol miristato (PMA). Durante el estallido respiratorio los leucocitos liberan radicales libres derivados del oxígeno cuyo nivel de producción puede ser medido directamente como quimioluminiscencia (Sun y col., 1998; Egger y col., 2001; McLaren y col., 2003). La quimioluminiscencia corresponde a una reacción química capaz de emitir luz, cuyo principio se basa en que las moléculas del luminol al ser oxidadas por los radicales libres provenientes de los leucocitos, generan luz que puede ser medida a través de un luminómetro, expresando los valores en unidades Lux (Hoeben y col., 1998).

### Respuesta del hospedero

Otro aspecto a considerar en el estudio de la reactividad del huésped a la picada del insecto, es el hecho de que la primera respuesta visible corresponde a la formación de una reacción local en la piel del huésped que se caracteriza por ser de color rojo, presenta calor, edema y es dolorosa. La tumefacción es provocada inicialmente por el masivo influjo de células polimorfonucleares a la zona lesionada, seguida de la infiltración de células linfoides y macrófagos, presentando un alza durante la segunda semana, para decrecer significativamente una semana después (Naessens y col., 2003).

Cuando los invertebrados artrópodos pican a un animal inyectan su saliva. Ésta contiene antígenos y por tanto, induce respuestas inmunitarias. Algunos componentes de la saliva son de bajo peso molecular y por eso no funcionan normalmente como antígenos. Sin embargo, pueden unirse a proteínas cutáneas como el colágeno y funcionar como haptenos, estimulando la reacción inmunitaria mediada por células. En exposiciones subsiguientes, dichos haptenos inducen una reacción de hipersensibilidad retardada tipo IV (Tizard, 1995; Belkaid y col., 2000). Otros antígenos de la saliva pueden unirse a células de Langerhans de la epidermis e incidir una anticuerpos IgG y con la infiltración de basófilos. Otro tipo de respuesta a la saliva de los invertebrados es aquella mediada por IgE, a través de hipersensibilidad tipo I que puede inducir una inflamación cutánea importante y causar graves molestias al animal picado. En muchos otros casos, la formación de complejos inmunitarios de tipo sistémico puede llevar también al desarrollo de vasculitis y glomerulonefritis (hipersensibilidad tipo III) ((Tizard, 1995).

A este respecto, un estudio realizado usando gallinas como presa mostró que *T. infestans* selecciona aquellas que han recibido inmunización previa, ya sea por reiteradas picadas propinadas por vinchucas o por inmunización a través de inyecciones intradérmicas que contenían antígenos presentes en la saliva del insecto. Lo anterior abre una importante línea de estudio epidemiológico, toda vez que el estado inmunológico de la presa afectará el rendimiento alimentario del insecto manteniendo con ello la transmisión del agente de la enfermedad de Chagas. Además se ha observado que algunas colonias de ninfas de vinchucas alimentadas con sangre de hospederos previamente inmunizados, alcanzarían mayores tasas de crecimiento que aquellas alimentadas con presas no inmunizadas. Más aún, algunos investigadores piensan que existen evidencias suficientes para poder generar un producto vaccinal a partir de los componentes de la saliva de la vinchuca (Hecht y col., 2006).

## **HIPÓTESIS**

La exposición del conejo europeo a la picada de *M. spinolai* origina variaciones bioquímicas, hematológicas y hormonales que se pueden asociar a una condición de estrés.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Contribuir al conocimiento de la respuesta local y sistémica del conejo europeo frente a la picadura de *Mepraia spinolai*.

### **Objetivos Específicos**

1. Obtener valores de hemograma, concentración de cortisol plasmático, glicemia y producción de radicales libres pre y post manejo experimental en conejos.
2. Conocer las variaciones del hemograma, concentración de cortisol plasmático, glicemia, así como la producción de radicales libres, frente a picaduras de *M. spinolai* reiteradas en el tiempo y compararlas con aquellas provocadas por la punción con aguja fina.
3. Medir la respuesta local en el punto de picadura y de punción.
4. Establecer si la modificación de la producción de radicales libres puede ser usado como medida de estrés en el conejo europeo.



## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **Animales experimentales**

Se utilizaron 9 ejemplares de conejo europeo (*O. cuniculus*) machos y hembras de 2,5 a 3,0 kg, de alrededor de 6 meses de edad, obtenidos del criadero de FAVET y observados como sanos al examen físico. Se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos de 3 individuos cada uno y cada grupo se denominó grupo 1- 2 y 3, respectivamente.

### **Manejo de los animales experimentales**

Los conejos fueron alimentados *ad libitum* en base a pradera natural y alfalfa durante 8 horas diarias. Transcurridas tres semanas de adecuación a las rutinas de alimentación y examen físico, se inició el manejo experimental de los grupos, así como también la toma de muestras. Para este fin, aquellos pertenecientes al grupo 1 fueron expuestos a la picada de una de tres vinchucas negativas a la enfermedad de Chagas (ninfas estadio III), contenidas en bolsas de tul cuyo cuello elasticado se adosó a la oreja izquierda. Aquellos del grupo 2, fueron sometidos a una punción con aguja fina que se realizó a 1,0 cm de la base de la oreja izquierda en el pliegue caudal, utilizando para ello una aguja de 27,5 G (tuberculina). Finalmente, el grupo 3 correspondió al grupo control. Todos y cada uno de los manejos experimentales se comenzaron estrictamente a las 9:00 en punto de la mañana minimizando así variaciones circadianas fóticas (Toledo y col., 2004).

## **Método.**

Toda vez que se realizaron los muestreos de toma de sangre y con el fin de provocar los mínimos efectos en la respuesta de estrés, se procedió a administrar a cada ejemplar 10 mg de Ketamina al 10% por kg de peso vivo (vía oral) como sedante. Además, como anestésico local se aplicó lidocaína al 10% en crema en la vena marginal de la oreja derecha antes de la extracción de la sangre. Para cada uno de los tres días de muestreo (días 1, 2 y 3), el tiempo 0 correspondió al valor tomado como basal 24 horas previas al evento estresor. En el tiempo 0 se obtuvieron los valores de quimioluminiscencia, hemograma, glicemia y cortisol plasmático para cada ejemplar dentro de cada grupo.

La obtención de las muestras seriadas para hemograma (recuento de eritrocitos, recuento diferencial de leucocitos, esto es, neutrófilos o heterófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos, monocitos), glicemia y cortisol plasmático, se realizaron transcurridos los primeros 5, 30, 60 minutos y luego a las 24 y 48 horas del evento estresor (Jain, 1993).

En la determinación de glicemia se utilizó la prueba enzimática AA según el protocolo indicado por el laboratorio Wiener 2000 (Rosario, Argentina) y en la determinación de la concentración de cortisol plasmático de muestra obtenida con heparina, se realizó por medio de radioinmunoanálisis (RIA).

En el protocolo de quimioluminiscencia se emplearon 10 µl de la primera muestra de sangre obtenida en cada grupo. Para los tubos control se utilizó 10 µl de PBS y 90 µl de luminol como amplificador de la reacción. Para los tubos en los que se usó estimulación in vitro con PMA se añadieron 10 µl de PMA y 90 µl de luminol. De esta forma se obtienen las curvas de decaimiento a los 5-10-15-20-25 y 30 minutos. Por medio de este método se cuantificó la producción de radicales libres de la muestra obtenida con heparina.

Para ello se dispuso de un *chemiluminometer* portátil (Junio LB 9509 E GIG Berthold Germany) y tanto los tubos como los reactivos usados fueron mantenidos en estufa a 37°C (Mc Laren y col., 2003).

Por último, se determinó la respuesta local en el sitio de la picada o punción, según corresponda, a través del uso del cutímetro en los tiempos 5-30-60 minutos y transcurridas las primeras 24 y 48 horas. El examen directo del sitio de picada descartará zonas de inflamación generadas por exposiciones hechas con anterioridad.

Se efectuaron 2 repeticiones del protocolo antes descrito por cada ejemplar con un intervalo de 10 días, que corresponden a los días 2 y 3, respectivamente.

## **ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

Se obtuvieron las curvas de decaimiento de la quimioluminiscencia y se determinaron los mínimos y máximos para cada uno de los tres grupos en el tiempo.

Los resultados del hemograma, glicemia, quimioluminiscencia, concentración plasmática de cortisol y cutímetro fueron descritos usando promedios y desviación estándar.

Los datos se analizaron en un ANDEVA para parcelas divididas de muestras repetidas en el tiempo usando la prueba de Tuckey en el que cada ejemplar correspondió a su propio control.

## **RESULTADOS**

### **Cortisol plasmático**

En los niveles de cortisol existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el grupo punción y el grupo vinchuca, entre el grupo punción y el grupo control, siendo tal diferencia consistente para los 3 momentos de medición (ver anexo gráficos 1, 2 y 3), puesto que no existe diferencia estadísticamente significativa para el cortisol entre los días que se efectuó la toma de muestras (días 1, 2 y 3).

### **Glicemia**

Los niveles de glicemia en cada día de muestreo (ver anexo gráficos 4, 5 y 6), presentan diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el grupo control y el grupo vinchuca, entre el grupo control y el grupo punción.

Además, se observa diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) sólo entre el primer día de muestreo (día 1) con los otros 2 días (días 2 y 3).

### **Quimioluminiscencia**

Existe diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo vinchuca, entre el grupo punción y el grupo vinchuca al realizar la prueba utilizando PMA para cada día de muestreo (ver anexo gráficos 7, 8 y 9). Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los días 1 y 3 de muestreo con o sin el uso de PMA.

Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los días 1 y 2 de muestreo al utilizar PMA.

### Cutímetro

Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el grupo punción y el grupo control, entre el grupo punción y el grupo vinchuca para cada día de muestreo (ver anexo gráficos 10, 11 y 12).

No existe diferencia estadísticamente significativa entre los días de muestreo (días 1, 2 y 3).

### Eritrocitos

Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el grupo punción y el grupo vinchuca, entre el grupo punción y el grupo control para cada día de muestreo (ver anexo gráficos 13, 14 y 15).

No existe diferencia estadísticamente significativa entre los días de muestreo (días 1, 2 y 3).

### Leucocitos

Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los 3 grupos para cada día de muestreo (ver anexo gráficos 16, 17 y 18).

Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los días 1 y 2 de muestreo.

### Heterófilos

Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el grupo control y el grupo vinchuca, entre el grupo control y el grupo punción para cada día de muestreo (ver anexo gráficos 19, 20 y 21).

Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el segundo día de muestreo (día 2) con los otros 2 días (días 1 y 3).

### Linfocitos

Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el grupo control y el grupo vinchuca, entre el grupo control y el grupo punción para cada día de muestreo (ver anexo gráficos 22, 23 y 24).

Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el segundo día de muestreo (día 2) y los otros 2 días (días 1 y 3).

### Eosinófilos

Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el grupo control y el grupo vinchuca, entre el grupo control y el grupo punción para cada día de muestreo (ver anexo gráficos 25, 26 y 27).

No existe diferencia estadísticamente significativa entre los días de muestreo (días 1, 2 y 3).

### Basófilos

Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el grupo control y el grupo vinchuca, entre el grupo control y el grupo punción para cada día de muestreo (ver anexo gráficos 28, 29 y 30).

Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los días 1 y 3 de muestreo.

### Monocitos

Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el grupo control y el grupo vinchuca, entre el grupo control y el grupo punción para cada día de muestreo (ver anexo gráficos 31, 32 y 33).

Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre el primer día de muestreo (día 1) y los otros 2 días (días 2 y 3).



## Estadística descriptiva y análisis de la varianza

Tabla N°1. Medición promedio de cortisol plasmático en los 3 grupos de tratamiento.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Media / D.E</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Control</b>	54	1,2 <sup>a</sup> ± 0,1	0,90	1,37
<b>Vinchuca</b>	54	1,1 <sup>a</sup> ± 0,1	0,90	1,26
<b>Punción</b>	52	1,5 <sup>b</sup> ± 0,4	0,96	2,35

Letras distintas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Tabla N°2. Medición promedio de glicemia en los 3 grupos de tratamiento.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Media / D.E</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Control</b>	52	123,8 <sup>a</sup> ± 18,4	81	166
<b>Vinchuca</b>	54	139,8 <sup>b</sup> ± 35,6	81	208
<b>Punción</b>	54	140,2 <sup>b</sup> ± 27,7	94	209

Letras distintas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Tabla N°3. Medición promedio de quimioluminiscencia sin PMA en los 3 grupos de tratamiento.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Media / D.E</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Control</b>	63	675,9 <sup>a</sup> ± 298,1	206	1772
<b>Vinchuca</b>	63	938,4 <sup>b</sup> ± 572,9	125	2411
<b>Punción</b>	63	756,9 <sup>ab</sup> ± 418,2	188	1658

Letras distintas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Tabla N°4. Medición promedio de quimioluminiscencia con PMA en los 3 grupos de tratamiento.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Media / D.E</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Control</b>	63	1407,7 <sup>a</sup> ± 997,1	411	5114
<b>Vinchuca</b>	63	1969,4 <sup>b</sup> ± 1253,5	458	5200
<b>Punción</b>	63	1426,0 <sup>a</sup> ± 662,0	503	3378

Letras distintas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Tabla N°5. Medición promedio de cutímetro en los 3 grupos de tratamiento.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Media / D.E</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Control</b>	54	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0	0	0
<b>Vinchuca</b>	54	0,1 <sup>a</sup> ± 0,1	0	0,2
<b>Punción</b>	54	1,0 <sup>b</sup> ± 1,0	0	3

Letras distintas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Tabla N°6. Medición promedio de eritrocitos en los 3 grupos de tratamiento.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Media / D.E</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Control</b>	54	5514,8 <sup>a</sup> ± 130,2	5230	5800
<b>Vinchuca</b>	54	5485,2 <sup>a</sup> ± 521,2	4550	6230
<b>Punción</b>	54	6007,8 <sup>b</sup> ± 509,9	5370	6900

Letras distintas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Tabla N°7. Medición promedio de leucocitos en los 3 grupos de tratamiento.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Media / D.E</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Control</b>	54	7746,3 <sup>a</sup> ± 1215,5	5500	10200
<b>Vinchuca</b>	54	6959,3 <sup>b</sup> ± 1484,7	4750	10300
<b>Punción</b>	54	8771,3 <sup>c</sup> ± 1522,4	6150	12400

Letras distintas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Tabla N°8. Medición promedio de heterófilos en los 3 grupos de tratamiento.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Media / D.E</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Control</b>	53	43,0 <sup>a</sup> ± 7,7	30	64
<b>Vinchuca</b>	54	52,2 <sup>b</sup> ± 5,1	42	62
<b>Punción</b>	54	51,1 <sup>b</sup> ± 10,6	31	72

Letras distintas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Tabla N°9. Medición promedio de linfocitos en los 3 grupos de tratamiento.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Media / D.E</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Control</b>	53	52,4 <sup>a</sup> ± 7,2	35	65
<b>Vinchuca</b>	54	45,9 <sup>b</sup> ± 4,7	38	56
<b>Punción</b>	54	47,0 <sup>b</sup> ± 10,6	26	68

Letras distintas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Tabla N°10. Medición promedio de eosinófilos en los 3 grupos de tratamiento.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Media / D.E</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Control</b>	53	2,3 <sup>a</sup> ± 1,9	0	8
<b>Vinchuca</b>	54	0,9 <sup>b</sup> ± 0,8	0	3
<b>Punción</b>	54	0,7 <sup>b</sup> ± 0,7	0	2

Letras distintas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Tabla N°11. Medición promedio de basófilos en los 3 grupos de tratamiento.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Media / D.E</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Control</b>	53	0,6 <sup>a</sup> ± 1,1	0	6
<b>Vinchuca</b>	54	0,1 <sup>b</sup> ± 0,3	0	1
<b>Punción</b>	54	0,2 <sup>b</sup> ± 0,4	0	1

Letras distintas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Tabla N°12. Medición promedio de monocitos en los 3 grupos de tratamiento.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Media / D.E</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Control</b>	53	1,7 <sup>a</sup> ± 1,8	0	8
<b>Vinchuca</b>	54	0,8 <sup>b</sup> ± 0,9	0	3
<b>Punción</b>	54	1,0 <sup>b</sup> ± 0,9	0	3

Letras distintas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

### **Aspectos Generales.**

El estudio de la conexión entre el ciclo silvestre y el ciclo doméstico de la enfermedad de Chagas es uno de los problemas centrales que ha sido considerado por la Organización Mundial para la Salud durante el periodo 2000-2010. Esta conexión se realiza principalmente por medio de mamíferos vertebrados que serían a la vez fuentes de alimentación para los triatomíneos y reservorios silvestres de *T. cruzi* (Canals y col., 2001).

En nuestro país, *M. spinolai* ha sido encontrada en peridomicilios y ocasionalmente dentro de las habitaciones humanas lo que podría indicar el inicio de un proceso de transición, ya que ambas vías mencionadas se han producido en el rango de distribución geográfica de este insecto que además ha presentado altos índices de prevalencia de la infección (Órdenes y col., 1996). El estudio de la respuesta estresora del conejo silvestre frente a la picada de vinchuca puede orientarnos hacia el entendimiento de la importancia de éste último como hospedero de *M. spinolai* y establecer si este insecto puede llegar a ser potencialmente peligroso, sobre todo en aquellas zonas donde su hábitat coincide con el hombre (Acuña, 2001; Canals, 2001).

Las distintas formas utilizadas en la medición del estrés agudo o crónico en seres vivos, involucran la toma de muestras a partir de productos o sustancias elaboradas por el organismo animal y habitualmente la manipulación o el manejo de laboratorio de los mismos. Ambos eventos pueden llegar a ser una importante limitante del procedimiento y/o conducir a error en los resultados (Voigt y col., 2004).

De allí que el grado de invasividad usada en la técnica debe ser el mínimo posible, asegurando a la vez las recomendaciones y exigencias para el cuidado y uso de animales de laboratorio establecidas por el "Committee on the Care and Use of Laboratory Animals of

the Institute of Laboratory Animal Resources” definidas en la “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Committee on the Care and Use of Laboratory Animals, 1996).

### **Variable cortisol sanguíneo.**

El cortisol plasmático evidenció un incremento significativo en el grupo sometido a punción, hecho que se verificó para cada día del manejo experimental sin diferencia significativa. Tal observación nos permite afirmar que el manejo experimental en cuanto a punción se refiere, es capaz de ser registrado y elaborado por el organismo animal como una condición importante de estrés. Lo anterior ocurriría debido a que tal desafío activa y modifica la condición basal del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal liberando corticosteroides al torrente sanguíneo, conforme a lo reportado por otros autores (Cook y col., 2000; Voigt y col., 2004).

Tanto el grupo control como el grupo sometido a picada de vinchuca mostraron un aumento moderado del cortisol plasmático tras el manejo experimental (1,05 µg/dL) contrastando con el grupo sometido a punción que presentó incrementos que casi duplicaron al valor basal los primeros 30 a 60 minutos post- experimentales, situación que se repitió en las dos mediciones que le sucedieron, aunque no se presentó diferencia significativa entre los grupos (Loeb y Quimby, 1989).

En los tres manejos experimentales se verificó un lento, pero sostenido descenso hacia los valores normales pasadas las 24 horas del evento estresor, hecho que confirma que la respuesta corticoadrenal observada corresponde a un evento temporal y de adaptación a las condiciones inmediatas en relación al estrés agudo que genera tal desafío (Korte y col., 1993; Most y Palme, 2002). Los resultados así obtenidos ratifican el uso de esta hormona como un indicador de estrés agudo en animales toda vez que sea medido a

través de muestras repetidas en el tiempo, en los tiempos pertinentes y por medio de una técnica acreditada, tal como el radio inmuno ensayo plasmático (Most y Palme, 2002; Shao y col., 2003).

### **Variable glucosa sanguínea.**

La variable en cuestión mostró un incremento significativo post-experimental en los tres grupos respecto, tanto del valor basal como del rango considerado como normal para la especie (120 mg/ dL) (Loeb y Quimby, 1989). Este hallazgo dice relación con el efecto hiperglicemiante y neoglucogénico que poseen los glucocorticoides. Las catecolaminas liberadas frente a situaciones de estrés contribuyen, también, a esta alza por su acción hiperglicemiante, lipolítica y glicogenolítica (Hoffman y Lefkowitz, 1996). Al igual que el cortisol plasmático, los niveles de glucosa en sangre disminuyen progresivamente en el tiempo desde su máximo entre los primeros 30 a 60 minutos post desafío, para normalizarse a las 24 horas. Lo anterior respalda el hecho de que el desafío al que fueron sometidos los distintos grupos, obedece a un estrés agudo acotado en el tiempo. No obstante lo anterior, el valor de  $R^2$  bajo (0,39) para la prueba de Tuckey y la aparición de diferencia significativa para el primer día de muestreo, avalan el carácter complejo de la regulación del metabolismo de los carbohidratos en situaciones de estrés, cuyas variaciones dependen de otras hormonas como: insulina, glucagón, catecolaminas y del nivel de ingesta y efectos fóticos, además del cortisol plasmático (Schimmer y Parker, 1996; Von Borrel, 2001).

Nuestros resultados confirman a esta variable como un indicador confiable de estrés, a condición de que se estudie y analice simultáneamente con otros parámetros asociados a la medición de estrés en seres vivos. Tanto nuestros resultados de cortisol plasmático como de glicemia corroboran la necesidad de utilizar métodos menos invasivos

en la obtención de muestras para medir éstos parámetros y la dificultad que subyace en eventuales estudios de estrés en animales en condiciones naturales, como ha sido informado anteriormente por otros autores (Von Borrel, 2001; Most y Palme, 2002; Voigt y col., 2004).

### **Variable quimioluminiscencia.**

Los niveles de quimioluminiscencia estimulada con PMA mostraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo sometido a la picada de vinchuca, como también entre este último grupo y el grupo sometido a punción. En el primer día de manejo experimental hubo una disminución en la actividad de quimioluminiscencia para los tres grupos que fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Este hallazgo pudo obedecer a la condición de estrés provocada en los individuos al realizar la toma de muestra por primera vez, puesto que para los otros días de muestreo no se observaron diferencias significativas.

La reacción de quimioluminiscencia registrada fue notoriamente menor en el grupo sometido a punción y se observó principalmente durante los primeros 20 minutos del manejo experimental. Los tres grupos recuperan los niveles basales lentamente luego de 20 a 30 minutos del desafío ( $p \leq 0,05$ ).

Lo anterior muestra que el grupo sometido a punción manifestaría una condición de estrés agudo que no se observa en ausencia de desafío, al tiempo que descarta un estrés crónico.

Nuestros resultados muestran que la estimulación con PMA confiere a la prueba una mayor sensibilidad en la determinación de niveles de quimioluminiscencia, y que el luminol corresponde a un amplificador válido para este tipo de reacción, lo que concuerda



con observaciones hechas por otros autores (Sun y col., 1998; Krasowska y col., 2000; McLaren y col., 2003).

No obstante el  $R^2$  para la prueba de Tuckey igual a 0,17 y 0,21 para quimioluminiscencia sin y con el uso de PMA, respectivamente, evidencian que la prueba explica de manera parcial la variabilidad del modelo y, por tanto, la técnica puede y debe perfeccionarse pues la variación individual es de importancia gravitante. Por otro lado, se verifica que ha resultado ser un método rápido, confiable y práctico, tal como ha sido informado por otros autores (McLaren y col., 2003).

#### **Variable respuesta local a través del uso de cutímetro.**

Según nuestras observaciones el registro de esta variable presentó un aumento significativo post-experimental sólo en el grupo sometido a punción ( $p \leq 0,05$ ).

Tal observación fue verificada en los otros días de muestreo sin encontrarse diferencia significativa entre ellos y correspondió a una lesión eritematosa pequeña sin características de pápula u otra lesión de significancia.

La falta de diferencia estadística entre el grupo control y el grupo sometido a picada de vinchuca, podría deberse a que el conejo efectivamente sea menos reactivo a este desafío, lo que concordaría con los resultados para cortisol plasmático, glucosa y recuento de eritrocitos totales, como se analizará más adelante. Surge la interrogante de si la utilización de vinchucas de la especie *M. spinolai* libres de *T. cruzi* disminuye la reacción local ya que en estudios realizados por otros autores, aunque en otras especies, se observa una clara respuesta local ante dicho manejo experimental con vinchucas infectadas (Nascimento y col., 2001; Naessens y col., 2003). En tal sentido, además, pudiera ser relevante el estado de inmunización previo del hospedero frente a *T. cruzi*, pues tal condición puede llegar a

provocar cambios en la conducta alimentaria de las vinchucas al momento de seleccionarlo o no como presa (Hecht y col., 2006).

Por todo lo anterior, pensamos que el estudio de la respuesta local a la picada de vinchuca es de importancia primaria en el estudio de la reactividad del huésped a dicho desafío.

### **Variable recuento de eritrocitos**

El recuento de eritrocitos totales tuvo un aumento significativo en el grupo sometido a punción, alza que se mantuvo hasta pasadas las 48 horas del manejo experimental. No se observaron diferencias significativas entre los días en que se llevaron a cabo las mediciones.

Se debe tener en cuenta que si bien los aumentos eritrocitarios son consistentes desde la etapa pre-experimental a la post experimental, en todos los casos tal fluctuación ocurrió dentro de los parámetros considerados como normales para la especie (Jain, 1993).

Dicha observación correspondería al incremento de la masa eritroide circulante causada por la contracción del bazo en respuesta a una condición de estrés temporal. De acuerdo a los resultados, esta variable pareciera ser un indicador apropiado frente a una condición de estrés agudo (Willard y col., 1993; Meyer y Harvey, 1999; Rudolph y Villouta, 2002).

### **Variable recuento de leucocitos.**

El número de leucocitos mostró diferencia significativa en los tres grupos, siendo el grupo sometido a punción el que evidenció los mayores aumentos, principalmente el primer y segundo día de muestreo. Para cada día de muestreo se observó diferencia significativa. Luego de pasadas las primeras 24 horas post experimentales los valores descienden lentamente, para llegar a las 48 horas a alcanzar los valores basales (Jain, 1993). La neutrofilia observada puede ser provocada por el alza de cortisol plasmático que aumenta la liberación de neutrófilos desde su reserva en la médula ósea hacia la circulación general, a la vez que disminuyen la adherencia y la marginación de éstos hacia los endotelios, reduciendo su salida hacia los tejidos (Rudolph y Villouta, 2002). Además, las catecolaminas también aumentan los índices leucocitarios causando neutrofilia y eosinopenia (Willard y col., 1993; Hoffman y Lefkowitz, 1996). En el grupo sometido a la picada de vinchuca se observó diferencia significativa respecto de los otros dos grupos con alzas leves en los recuentos pasados los primeros 30 a 60 minutos post manejo experimental, con descensos lentos, pero sostenidos hacia los valores normales a las 24 a 48 horas presentes en los tres días de muestreo.

Según lo que observamos en nuestras mediciones la picada de vinchuca originaría una respuesta de estrés determinada por la leucocitosis manifestada por el grupo frente a tal desafío ( $p \leq 0,05$ ). Podemos señalar, entonces, que el recuento de leucocitos totales es un adecuado estimador de una condición de estrés a corto plazo.

### **Variable recuento de heterófilos.**

En esta medición se observó diferencia significativa tanto en el grupo sometido a punción como en el grupo sometido a picada de vinchuca respecto del grupo control, con un aumento significativo presente en el segundo día del manejo experimental ( $p \leq 0,05$ ). Estas observaciones indicarían que ambos desafíos provocan la eficaz activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal que es capaz de generar una respuesta de estrés agudo determinada por el aumento de heterófilos circulantes luego de los 30 minutos post-experimentales y por el lento descenso a los valores basales transcurridas las 48 horas (Jain, 1993).

Dicho aumento en el recuento de heterófilos, también obedece al alza del cortisol plasmático y de catecolaminas que se verifican ante una situación de estrés (Willard y col., 1993; Meyer y Harvey, 1999; Rudolph y Villouta, 2002).

### **Variable recuento de linfocitos.**

Para este parámetro se observaron disminuciones significativas entre los grupos sometidos a punción y picada de vinchuca respecto del grupo control.

Aunque hubo una diferencia estadística el segundo día de manejo experimental, la tendencia a la disminución de los valores durante las primeras 24 horas, se mantuvo en los tres grupos ( $p \leq 0,05$ ). Hacia las 48 horas los valores retornan a lo considerado como rango normal (Jain, 1993). En el grupo sometido a picada de vinchuca, esta respuesta linfocitaria se manifiesta de manera menos notoria que en el grupo sometido a punción, aunque no alcanza significación estadística. La recuperación de los niveles dentro del rango de normalidad puede deberse a la condición temporal que significa el evento estresor. Las observaciones así descritas pueden asociarse al aumento de cortisol plasmático como

condición de estrés, durante las primeras 24 horas del manejo experimental, que disminuiría el número de leucocitos circulantes en algunas especies (Willard y col., 1993; Meyer y Harvey, 1999; Rudolph y Villouta, 2002). A partir de estos datos se concluye que el recuento de linfocitos puede ser beneficioso en el estudio del estrés a corto plazo.

### **Variable recuento de eosinófilos.**

La cuenta celular de eosinófilos tuvo una disminución significativa tanto para el grupo sometido a punción como para el grupo sometido a picada de vinchuca respecto del grupo control ( $p \leq 0,05$ ) y no se observó diferencia estadística entre los distintos días de manejo experimental. Además no hubo diferencia significativa entre ambos grupos frente al desafío. La eosinopenia fue transitoria pues pasados los primeros 30 a 60 minutos los recuentos vuelven a lo considerado como rango normal (Jain, 1993). La observación de menores recuentos de eosinófilos en los grupos descritos puede estar asociada con la liberación de mayores niveles de cortisol plasmático frente a cada desafío que constituye finalmente en un estímulo estresor agudo que es capaz en consecuencia de activar al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. No obstante aquello, cabe señalar que el recuento diferencial de eosinófilos en lepóridos y en otras especies habitualmente presenta valores bajos cuando no inexistentes (Willard y col., 1993; Meyer y Harvey, 1999; Rudolph y Villouta, 2002).

Además su identificación está supeditada a la técnica de preservación y de tinción de la muestra de sangre. Es por eso que en comparación a otros recuentos diferenciales de células sanguíneas, esta variable nos resulta menos prometedora que las anteriores en el estudio de la respuesta de estrés agudo en el conejo silvestre.

### **Variable recuento de basófilos**

Los recuentos de este tipo de células fueron extremadamente bajos e incluso inexistentes para algunos momentos del muestreo. Este hallazgo ha sido reportado por otros autores (Jain, 1993; Willard y col., 1993). Aunque existe una diferencia estadística para los grupos sometidos a punción y a picada de vinchuca frente al control, la diferencia estadística observada entre cada uno de los días de muestreo hace de la variación individual una importante dificultad para explicar el modelo estadístico más aún cuando la variabilidad asociada a la prueba es significativa ( $r^2 = 0,2$ ;  $p \leq 0,05$ ).

Por otro lado, la ausencia simultánea de eosinofilia y basofilia descartan una respuesta de tipo I o alérgica, propia de la respuesta de hipersensibilidad mediadas por IgE, frente a cada uno de los desafíos. Podemos decir entonces, que la respuesta local frente tanto al desafío de la punción como de la picadura de vinchuca no genera una respuesta identificable de hipersensibilidad.

Como se mencionó con anterioridad, nosotros pensamos que puede ser de gran utilidad en el estudio de la respuesta local a la picada de vinchucas de la especie *M. spinolai*, el uso de insectos infectados con el tripanosoma y el estatus inmunitario de la presa para así poder establecer el grado de significancia inmunológica de esta parasitosis en el conejo en particular y en los distintos hospederos en general.

### **Variable recuento de monocitos.**

La observación de la variación de este tipo celular indica una diferencia significativa para el grupo sometido a punción y para el grupo sometido a picada de vinchuca comparado con el grupo control ( $p \leq 0,05$ ). Además el primer día de muestreo tuvo una diferencia significativamente mayor que las otras dos que le sucedieron.

Luego de manifestar consistentemente una disminución dentro de las primeras 24 horas, los valores vuelven lentamente a los rangos considerados como normales hacia las 48 horas (Jain, 1993).

Al igual que lo comunicado por otros autores, el número de monocitos corresponde a un porcentaje marginal del frotis sanguíneo. Sin embargo, su población puede verse afectada frente a una condición de estrés. En tal caso su número en circulación sanguínea presenta disminuciones que se relacionan a la liberación de cortisol (Jain, 1993; Rudolph y Villouta, 2002).

Según nuestro parecer, la variación evidente del número de monocitos tras el desafío estresor, junto con la recuperación del pool circulante observada tras las primeras 48 horas y la escasa dificultad que presenta su identificación en un frotis directo de sangre entera, hacen que la variable antes descrita pueda ser usada satisfactoriamente en el estudio de estrés a corto plazo en el conejo silvestre.

## CONCLUSIONES

1. El manejo experimental consistente en la exposición del conejo silvestre a la picada de vinchucas de la especie *M. spinolai*, puede ser considerado un evento estresor capaz de generar una respuesta de estrés agudo medible en el tiempo a través de indicadores endocrinos, metabólicos y celulares que son manifestados por el animal tras ser sometidos a este procedimiento. A su vez el manejo experimental consistente en la exposición del conejo silvestre la punción con aguja fina, puede ser considerado un evento estresor por cuanto provoca una respuesta de estrés agudo medible en el tiempo por medio de indicadores endocrinos, metabólicos y celulares expresados por el animal.
2. Los indicadores usados en nuestro protocolo experimental presentan distintos rangos de sensibilidad frente al desafío, resultando para nosotros los más confiables en términos de permitir establecer un origen reconocible en su desviación al tiempo que son menos susceptibles a variabilidad individual, los siguientes: cortisol plasmático, recuento diferencial de leucocitos y la respuesta local medida por medio del cutímetro. A excepción de la variable glucosa sanguínea, todos los parámetros medidos permitieron identificar una respuesta de estrés agudo en el grupo sometido a punción con aguja fina, por lo tanto, es de importancia capital para este tipo de estudio, el empleo de pruebas que aseguren en lo posible una manipulación e incomodidad mínimas de los ejemplares experimentales antes, durante y posteriores al momento del muestreo en perfecta concordancia con las normas de bien estar animal.



3. En el grupo sometido a picada de vinchuca no hubo respuesta alguna que se pudiera asociar a una forma de hipersensibilidad aguda o retardada a este desafío, confirmando la favorable condición del conejo silvestre como hospedero-presa de *M. spinolai*.
4. En el estudio de la respuesta local a la picada de vinchuca queda de manifiesto la inquietud por contrastar estos resultados frente a aquellos que se pudieran obtener de eventuales conejos previamente inmunizados frente a picadas de vinchucas tanto infectadas como libres del protozoo.
5. La condición de estrés provocado en los animales luego de ambos procedimientos experimentales corresponde a una forma aguda de estrés, acotado en el tiempo que no causa las anormalidades fisiológicas asociadas al estrés crónico.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- **ACUÑA, M.** 2001. Efecto del hospedero sobre el crecimiento poblacional de *Mepraia spinolai* (Hemiptera, Reduviidae) en el laboratorio. Memoria de Título de Médico Veterinario. Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Santiago, Chile. 67 p.
  
- **ANGULO, V.M.** 2000. Aspectos ecológicos de la enfermedad de Chagas en el oriente de Colombia. MVZ-Córdoba. 5(1):64-68.
  
- **APT, W.; REYES, H.** 1990. Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica. Parasitol. Día. 14:23-40.
  
- **APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M.I.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; HAUCK, I.N.; SAN MARTÍN, A.M.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I.** 2006. Prevención y control de la enfermedad de Chagas. Ministerio de Salud, Depto. Enfermedades Transmisibles: Unidad de Enfermedades Emergentes y Reemergentes. Santiago, Chile. 48 p.
  
- **AXELROD, J.; REISINE, T.D.** 1984. Stress hormones: Their interaction and regulation. Science. 224:452-459.
  
- **BABIOR, B.** 1999. NADPH oxidase: an update. Blood. 93:1464-1476.
  
- **BABIOR, B.** 2000. Phagocyte and oxidative stress. Am. J. Med. 109:33-44.
  
- **BALM, P.H.M.** 1999. Preface. **In:** Stress physiology in animals. Shellfield, England, Shellfield Academic. pp. 5-6
  
- **BELKAID, Y.; VALENZUELA, J.G.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E.; SACKS, D.L.; RIBEIRO, J.M.** 2000. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: an adaptive response induced by the fly?. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:6704-6709.
  
- **BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; ROZAS, M.; CATTAN, P.E.; SOLARI, A.** 2005. DNA evidence of *Trypanosoma cruzi* in the Chilean wild vector *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 100(3):237-239.
  
- **BROOM, D.M.; JOHNSON, K.G.** 1993. Stress and animal welfare. Chapman and Hall. London, England. 228 p.
  
- **CABELLO, D.R.; LIZANO, E.; VALDERRAMA, A.** 1988. Efecto de la frecuencia alimentaria sobre algunos parámetros poblacionales de *Rhodnius neivai*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 83:441-446.

- **CANALS, M.; CATTAN, P.; EHRENFELD, M.** 1993. Algunas estimaciones numéricas de la importancia epidemiológica de los vectores de la Enfermedad de Chagas en Chile. *Parasitol. Día.* 17:79-86.
- **CANALS, M.; SOLÍS, R.; TAPIA, C.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.E.** 1999. Comparison of some behavioral and physiological feeding parameters of *Triatoma infestans* Klug, 1834 and *Mepraia spinolai* Porter, 1934, Vectors of Chagas disease in Chile. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94(5):687-692.
- **CANALS, M. CRUZAT, L.; MOLINA, M.; FERREIRA, A.; CATTAN, P.** 2001. Blood Host Sources of *Mepraia spinolai* (Heteroptera: Reduviidae), Wild Vector of Chagas Disease in Chile. *J. Med. Entomol.* 38(2):303-307.
- **CHIHUAILAF, R.; CONTRERAS, C.; WITTWER, G.** 2002. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet. Méx.* 33(3):265-283.
- **CLARK, R.** 1990. The human neutrophil respiratory burst oxidase. *J. Infect. Dis.* 161:1140-1147.
- **COMMITTEE ON THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS OF THE INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES.** 1996. Behavioral management. **In:** Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7° ed.. Nat. Acad. Press. Washington, USA. 228 p.
- **COOK, C.J.; MELLOR, D.J.; HARRIS, P.J.; INGRAM, J.R.; MATTHEWS, L.R.** 2000. Hands on and hands off measurement of stress. **In:** Moberg, G.P.; Mench, J.A. The biology of animal stress. CABI Publishing. New York, USA. pp. 123-146.
- **DAHLGREN, C.; KARLSSON, A.** 1999. Respiratory burst in human neutrophils. *J. Immunol. Methods.* 232:3-14.
- **DE SOUZA, E.B.; GRIGORIADIS, D.E.; WEBSTER, E.L.** 1991. Role of brain, pituitary and spleen corticotropin-releasing factor receptors in the stress response. *Methods Achiev. Exp. Pathol.* 14:23-44
- **DESOUZA, E.B.** 1993. Corticotropin-releasing factor and interleukin-1 receptors in the brain-endocrine-immune axis. Role in stress response and infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 697:9-27.
- **EGGER, G.; BURDA, A.; OBERNOSTERER, A.; MITTERHAMMER, H.; KAGER, G.; JUERGENS, G.; HOFER, H.P.; FABJAN, J.S.; PILGER, E.** 2001. Blood polymorphonuclear leukocyte activation in atherosclerosis: effects of aspirin. *Inflammation.* 25:129-135.
- **EWING, S.A.; LAY, D.C.; VON BORELL, E.** 1999. Farm animal well-being-stress physiology, animal behavior, and environmental design. Prentice Hall. New Jersey, USA. pp. 27-77.

- **FRIEND, W.G.; SMITH, J.J.B.** 1977. Factors affecting feeding by bloodsucking insects. *Annu. Rev. Entomol.* 22:309-331.
- **GARCÍA, A.; BAHAMONDE, M.; VERDUGO, S.; CORREA, J.; PASTENE, C.; TASSARA, R.; LORCA, M.** 2001. Infección transplacentaria por *Tripanosoma cruzi*: Situación en Chile. *Rev. Med. Chile.* 129:330-332.
- **HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.** 1989. Free radicals in Biology and Medicine. 2º ed. Clarendon Press. Oxford, USA. pp. 94-96.
- **HECHT, M.; BUSSACOS, A.C.; LOZZI, S.P.; SANTANA, J.M.; TEIXEIRA, A.R.L.** 2006. *Triatoma Infestans* chooses to feed upon immune prey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75(5):893-900.
- **HOEBEN, D.; BURVENICH, C.; MASSART, A.** 1998. Glucocorticosteroids and in vitro effect on chemiluminescence of isolated bovine blood granulocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 354:197-203.
- **HOFFMAN, B.B.; LEFKOWITZ, R.J.** 1996. Catecolaminas, fármacos simpaticomiméticos y antagonistas de los receptores adrenérgicos. **In:** Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; (Eds.). Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9 ed.. McGraw-Hill Interamericana. México D.F., México. pp. 211-264.
- **JAIN, N.C.** 1993. Essentials of Veterinary Hematology. Lea and Febiger. Pennsylvania, USA. 417 p.
- **JAKSIC, F.M.; FUENTES, E.R.** 1980. Why are native herbs in the chilean matorral more abundant beneath bushes microclimate or grazing. *J. Ecol.* 68:665-669.
- **KOOLHAAS, J.M.; KORTE, S.M.; DE BOER, S.F.; VAN DER VEGT, B.J.; VAN REENEN, C.G.; HOPSTER, H.; DE JONG, I.C.; RUIS, M.A.W.; BLOKHUIS, H.J.** 1999. Coping styles in animals: Current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23:925-935.
- **KORTE, S.M.; BOUWS, G.A.H.; BOHUS, B.** 1993. Central actions of corticotrophin-releasing hormone (CR-H) on behavioral, neuroendocrine and cardiovascular regulation: brain corticoid receptor involvement. *Horm. Behav.* 27:167-183.
- **KRASOWSKA, A.; ROSIAK, D.; SZKAPIAK, K.; LUKASZEWICZ, M.** 2000. Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds. *Current Top. in Bioph.* 24:89-95.
- **LOEB, W.; QUIMBY, F.** 1989. The Clinical Chemistry of Laboratory Animals. Pergamon Press. New York, USA. 519 p.

- **LORCA, M.** 2001. Enfermedad de Chagas transplacentaria en América latina experiencias de intervención en Chile. **In:** OPS. MSF. SSA. Curso de Diagnóstico, Manejo y Tratamiento de la Enfermedad de Chagas. (SSA-ES Tripanosomiasis Update). pp. 231-235.
- **LORCA, M.; GARCÍA, A.; BAHAMONDE, M.; FITZ, A.; TASSARA, R.** 2001a. Certificación serológica de la interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas en Chile. *Rev. Med. Chile.* 129:266-271.
- **LORCA, M.; GARCÍA, A.; CONTRERAS, M.; SCHENONE, H.; ROJAS, A.** 2001b. Evaluation of a *Triatoma infestans* elimination program by the decrease of *Trypanosoma cruzi* infection frequency in children younger than 10 years, Chile, 1991-1998. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65(6):861-864.
- **MARKET, M.; ANDREW, P.C.; BABIAR, B.M.** 1984. Measurement of superoxide production by human neutrophils. *Meth. Enzymol.* 105:358-365.
- **MCLAREN, G.W.; MCDONALD, D.W.; GEORGIU, C.; MATHEWS, F.; NEWMAN, C.; MIAN, R.** 2003. Leucocyte coping capacity: a novel technique for measuring the stress response in vertebrates. *Exp. Physiol.* 88(4):541-546.
- **MCLEAN, M.; SMITH, R.** 2001. Corticotrophin-releasing hormone and human parturition. *Reproduction.* 121:493-501.
- **MEYER, D.J.; HARVEY, J.W.** 1999. El Laboratorio en Medicina Veterinaria: Interpretación y Diagnóstico. 2º ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. 397 p.
- **MOBERG, G.P.; MENCH, J.A. (Eds.)** 2000. The Biology of Animal Stress: basic principles and implications for animal welfare. CABI. Pub. New York, USA. 377 p.
- **MONCAYO, A.** 1999. Progreso en la interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur. *Medicina.* 59(supl. 2): 120-124.
- **MÖSTL, E.; PALME, R.** 2002. Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23:67-74.
- **MUNCK, A.; GUYRE, P.M.; HOLBROOK, N.I.** 1984. Physiological functions of glucocorticoides in stress and their relationship to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* 5:25-44.
- **MUÑOZ, P.; THIERMANN, E.; ATÍAS, A.; ACEVEDO, C.** 1992. Enfermedad de Chagas congénita sintomática en recién nacidos y lactantes. *Rev. Chil. Pediatr.* 65(4):196-202.

- **NASCIMENTO, R.J.; SANTANA, J.M.; LOZZI, S.P.; ARAÚJO, C.N.; TEIXEIRA, A.R.L.** 2001. Human IGG<sub>1</sub> and IGG<sub>4</sub>: The main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65(3):219-226.
- **NAESSENS, J.; MWANGI, D.M.; BUZA, J.; MOLOO, S.K.** 2003. Local skin reaction (chancre) induced following inoculation of metacyclic trypanosomes in cattle by tsetse flies is dependent on CD4 T lymphocytes. *Parasite Immunol.* 25:413-419.
- **ÓRDENES, H.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.** 1996. Infección tripano-triatomina de *Triatoma spinolai* en una zona de riesgo epidemiológico. *Rev. Méd. Chile.* 124:1053-1057.
- **PORGES, S.W.** 1995. Cardiac vagal tone: A physiological index of stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 19:225-233.
- **RAMSEY, J.M.; ORDOÑEZ, R.; CRUZ-CELIS, A.; ALVEAR, A.L.; CHÁVEZ, V.; LOPEZ, R.** 2000. Distribution of domestic Triatominae and stratification of Chagas disease transmisión in Oaxaca, México. *Med. Vet. Entomol.* 14:1-12.
- **RAMSEY, J.M.; ORDOÑEZ, R.; TELLO, A.; POHLS, J.L.; SANCHEZ, V.; PETERSON, A.T.** 2003. Actualidades sobre la epidemiología de la Enfermedad de Chagas en México. **In:** Ramsey, J.M.; Tello, A.; Pohls, J.L. (Eds.) Iniciativa para la vigilancia y el control de la Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, México. pp. 85-103.
- **RODRÍGUEZ, J.M.; MENÉNDEZ, J.R.; LÓPEZ, Y.T.** 2001. Radicales libres en la Biomedicina y estrés oxidativo. *Rev. Cubana Med. Milit.* 30(1):36-44.
- **RUDOLPH, W.; VILLOUTA, G.** 2002. Manual de hematología clínica veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Departamento de Patología Animal. Universidad de Chile. Santiago, Chile. pp. 38-44.
- **SALLMANN, H.; BUSCHE, R.** 2004. Antioxidative capacity of epithelial membranes along the intestinal tract of guinea pig. **In:** Proceedings of the XIth Congress of the International Society of Animal Clinical Biochemistry. Valdivia, Chile. 4-8 abril 2004. Universidad Austral de Chile. pp. 1-4.
- **SCHIMMER, B.P.; PARKER, K.L.** 1996. Hormona suprarrenocorticotrópica; esteroides suprarrenocorticales y sus análogos sintéticos; inhibidores de la síntesis y los efectos de las hormonas suprarrenocorticales. **In:** Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; (Eds.). Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9 ed. McGraw-Hill Interamericana. México D.F., México. pp.1551-1580.
- **SCHOFIELD, C.J.** 1994. Triatominae, biología y control. Eurocommunica Publications. West Sussex, England. 80 p.

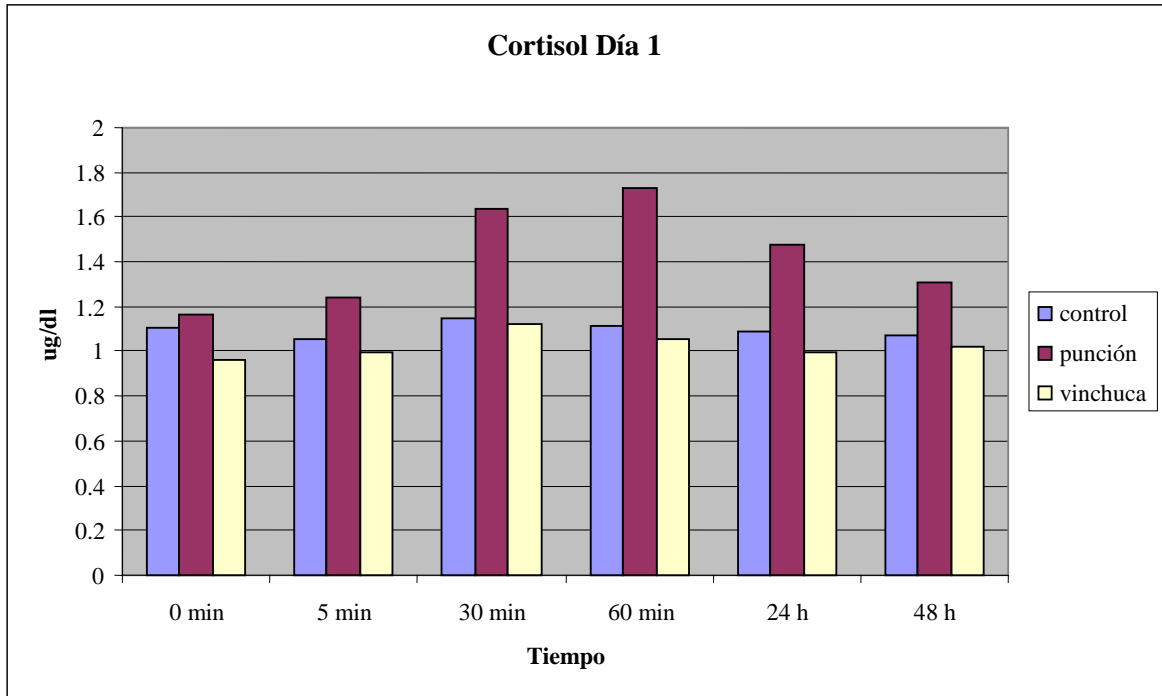
- **SHAO, F.; LIN, W.; WANG, W.; WASHINGTON, W.C.; ZHENG, L.** 2003. The effect of emotional stress on the primary humoral immunity of rats. *J. Psychopharmacol.* 17(2):179-183.
- **SIBILLE, Y.; REYNOLDS, H.** 1990. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141:471-501.
- **SLIVER, R.; MOLDOW, C.** 1995. Biochemistry and function of neutrophils. **In:** Williams, J.; Beutler, E.; Erslev, A.; Lichtman, M. *Haematology.* 3ª ed. 82:726-734.
- **SOULSBY, E.J.L.** 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7º ed. Nueva Editorial Interamericana. México D.F., México. pp. 545-546.
- **SPLETISTOESSER, W.; SHULFF-WERNER, P.** 2002. Oxidative stress in fagocytes: the enemy within. *Microsc. Res. Tech.* 57:441-455.
- **SUN, J.S.; TSUANG, Y.H.; CHEN, I.J.; HUANG, W.C.; HANG, Y.S.; LU, F.J.** 1998. An ultra-weak chemiluminescence study on oxidative stress in rabbits following acute thermal injury. *Burns.* 24:225-231.
- **TIZARD, I.** 1995. Destrucción del material extraño: El sistema mieloide. **In:** *Inmunología Veterinaria.* 4º ed. Nueva Editorial Interamericana. México D.F., México. pp: 19-30.
- **TOLEDO, R.; AGUILAR-ROBLERO, R.; CANCHOLA, E.; CABA, M.** 2004. Tracto retinohipotalámico en el conejo. *Univ. y Ciencia.* 20(40):55-60.
- **VALLEJOS, M.A.; REYES, P.A.** 1996. Tripanosomiasis Americana. Un problema sociomédico en México. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* 66:95-97.
- **VOIGT, C.C.; FAßBENDER, M.; DEHNHARD, M.; WIBBELT, G.; JEWGENOW, K.; HOFER, H.; SCHAUB, G.** 2004. Validation of a minimally invasive blood-sampling technique for the analysis of hormones in domestic rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha). *Gen. Comp. Endocrinol.* 135:100-107.
- **VON BORELL, E.H.** 2001. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. *J. Anim. Sci.* 79(E.Suppl.):E260-E267.
- **WILLARD, M.D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G.H.** 1993. Diagnóstico Clinicopatológico práctico en los animales pequeños. *Intermédica.* Buenos Aires, Argentina. 430 p.
- **WINGFIELD, J.C.; RAMENOFISKY, M.** 1999. Hormones and the behavioural ecology of stress. **In:** Balm, P.H.M, (Ed.). *Stress physiology in animals.* Sheffield Academic Press. Sheffield, England. pp.1-51.

- **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2000. The World Health Report 2000. Health systems: Improving performance. WHO. Geneva, Suiza. 215 p.
  
- **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2002. Control of Chagas disease: Second report of the WHO Expert Committee. WHO. Geneva, Suiza. 109 p. (WHO technical report series 905).
  
- **ZELEDÓN, R.; RABINOVICH, J.E.** 1981. Chagas disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. Annu. Rev. Entomol. 26:101-133.
  
- **ZULANTAY, I.; BOZÁN, F.; SALAS, C.; ZILLERUELO, N.; OSUNA, A.; GIL, L.C.; RODRÍGUEZ, J.; ROJAS, A.; EGEA, J.L.; WERNER, APT.** 2004. Enfermedad de Chagas crónica. Ausencia de *Triatoma infestans* intradomiciliario y persistencia de *Trypanosoma cruzi* circulante post-terapia. Parasitol. Latinoam. 59:93-98.

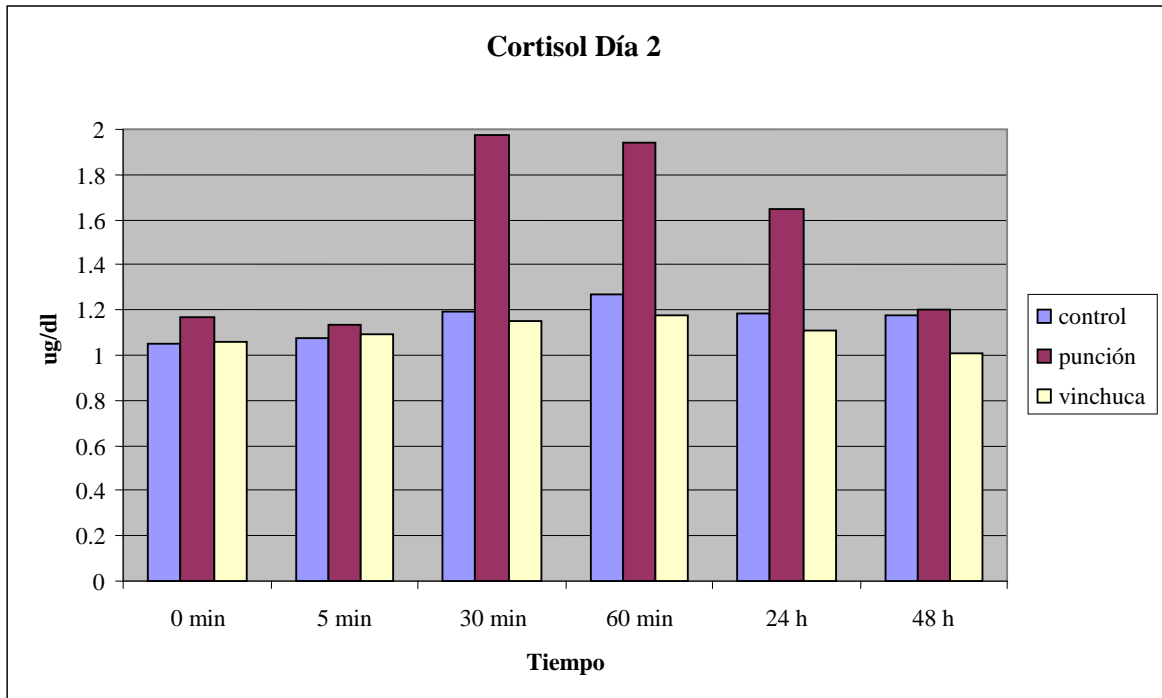


# ANEXOS

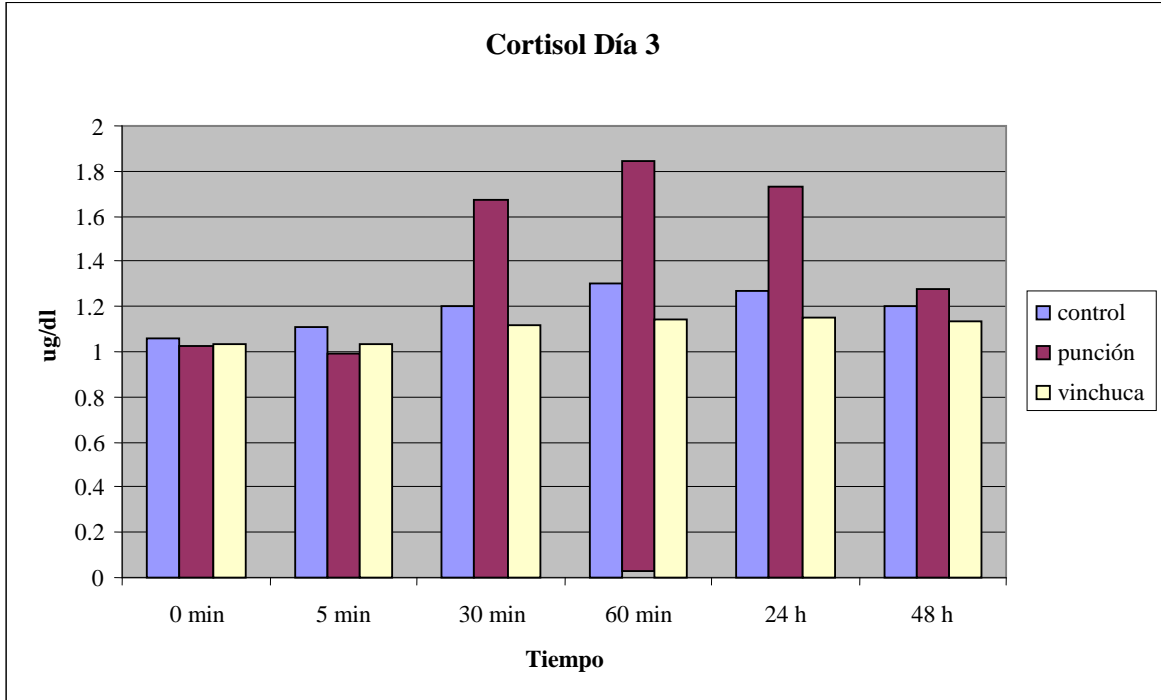
## Cortisol plasmático



**Gráfico 1**

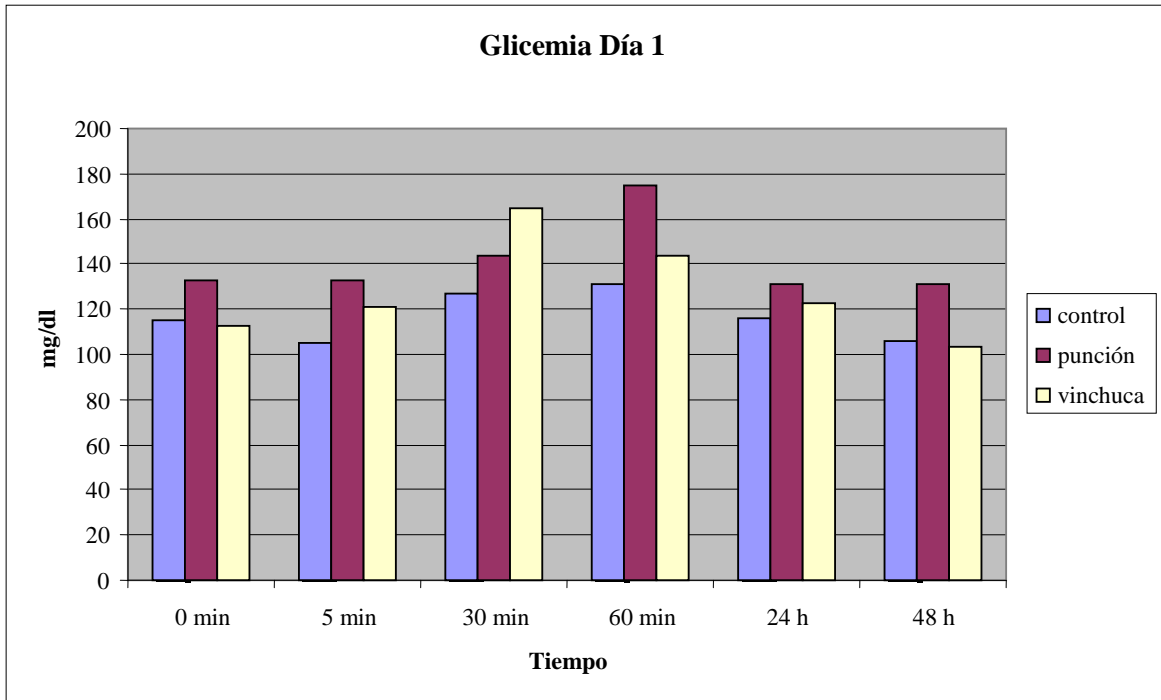


**Gráfico 2**

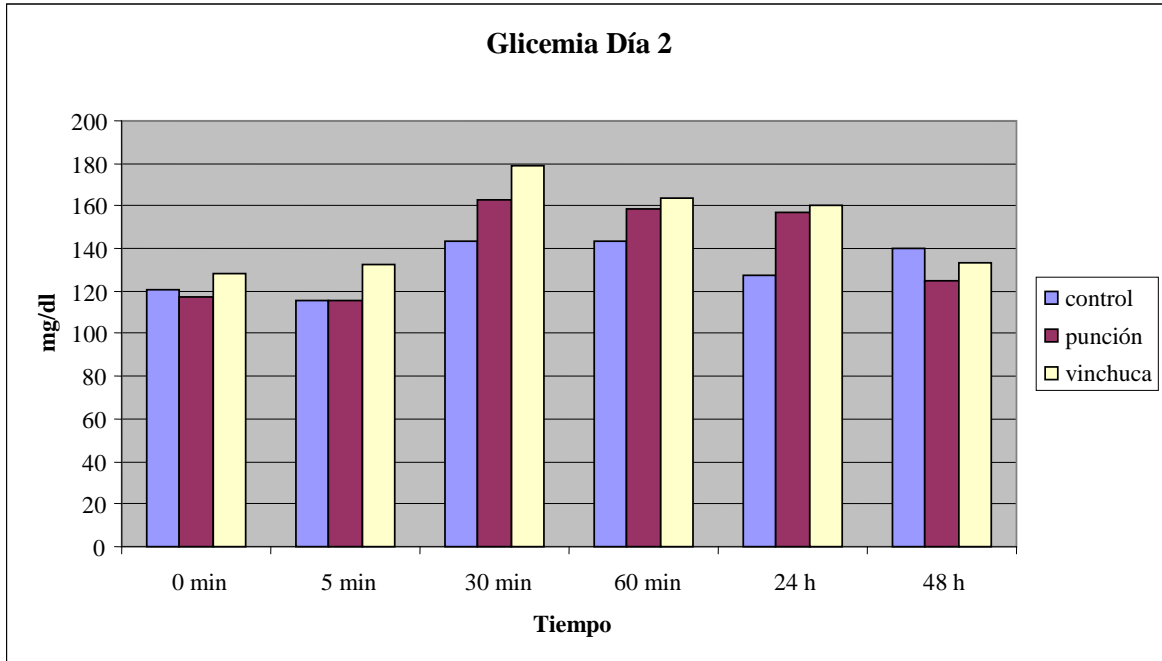


**Gráfico 3**

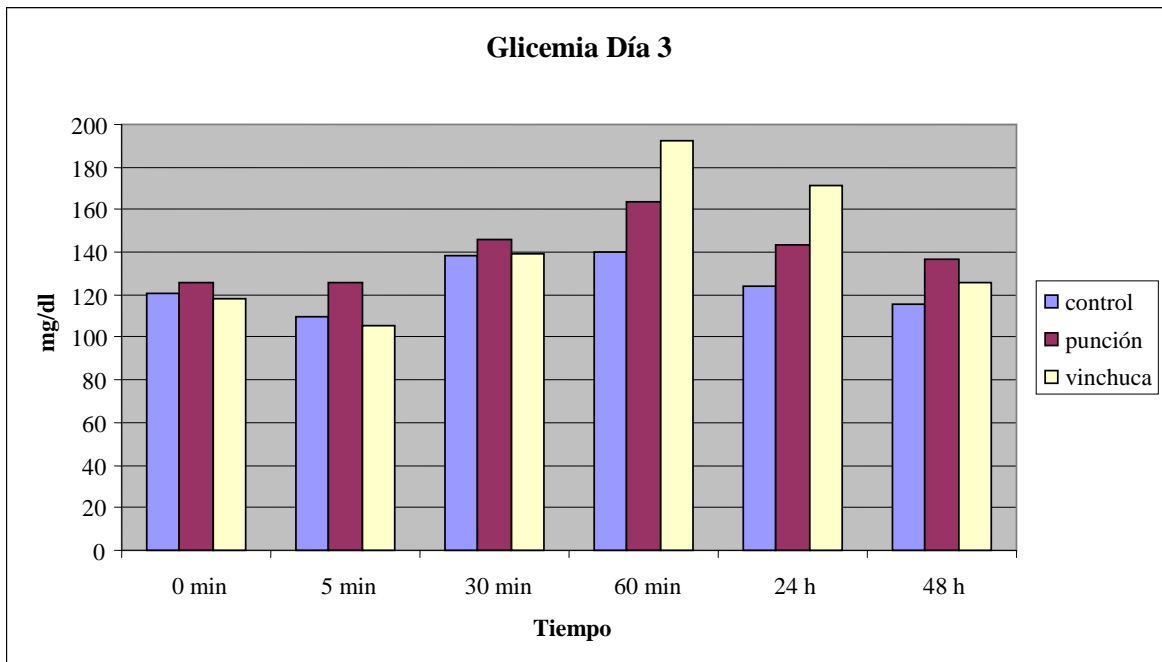
Glicemia



**Gráfico 4**



**Gráfico 5**



**Gráfico 6**

## Quimioluminiscencia

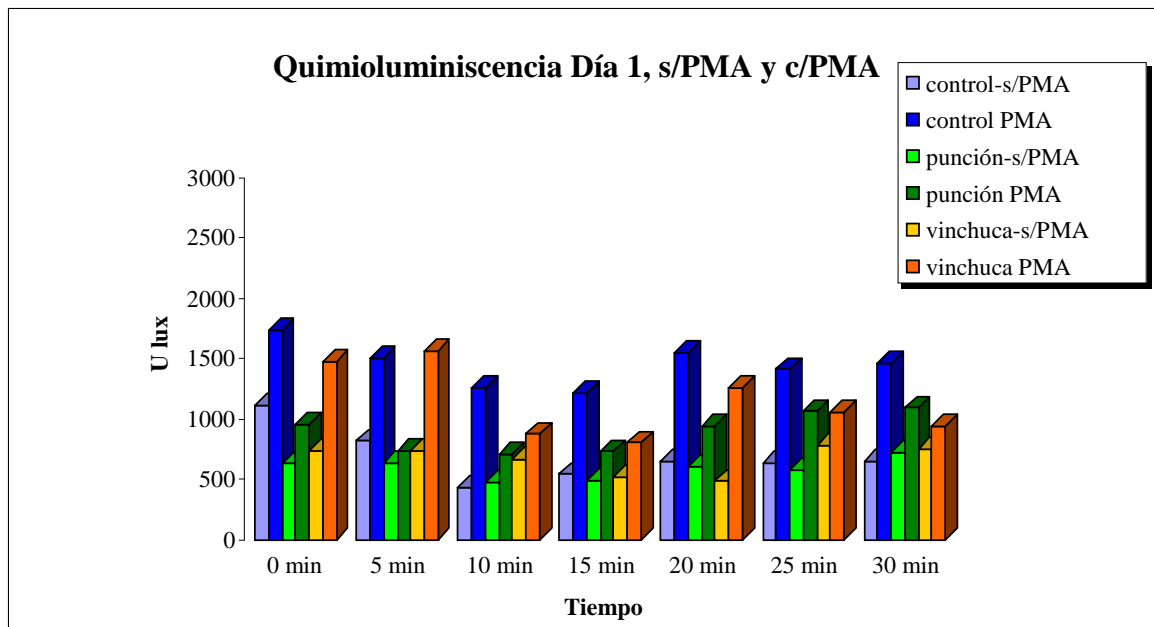


Gráfico 7

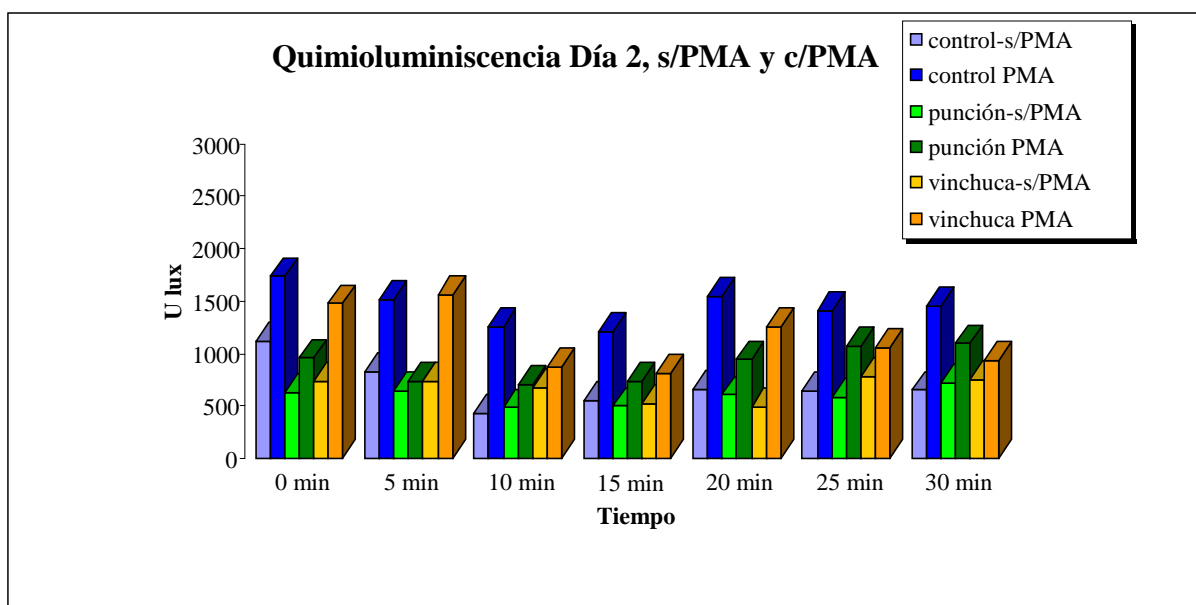


Gráfico 8

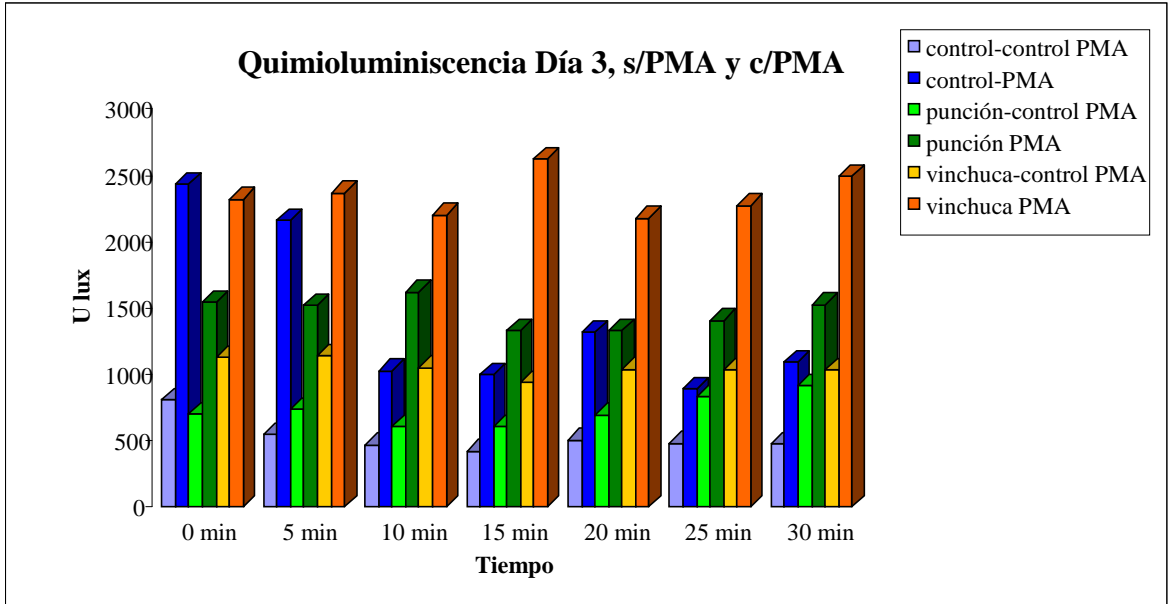


Gráfico 9

Cutímetro

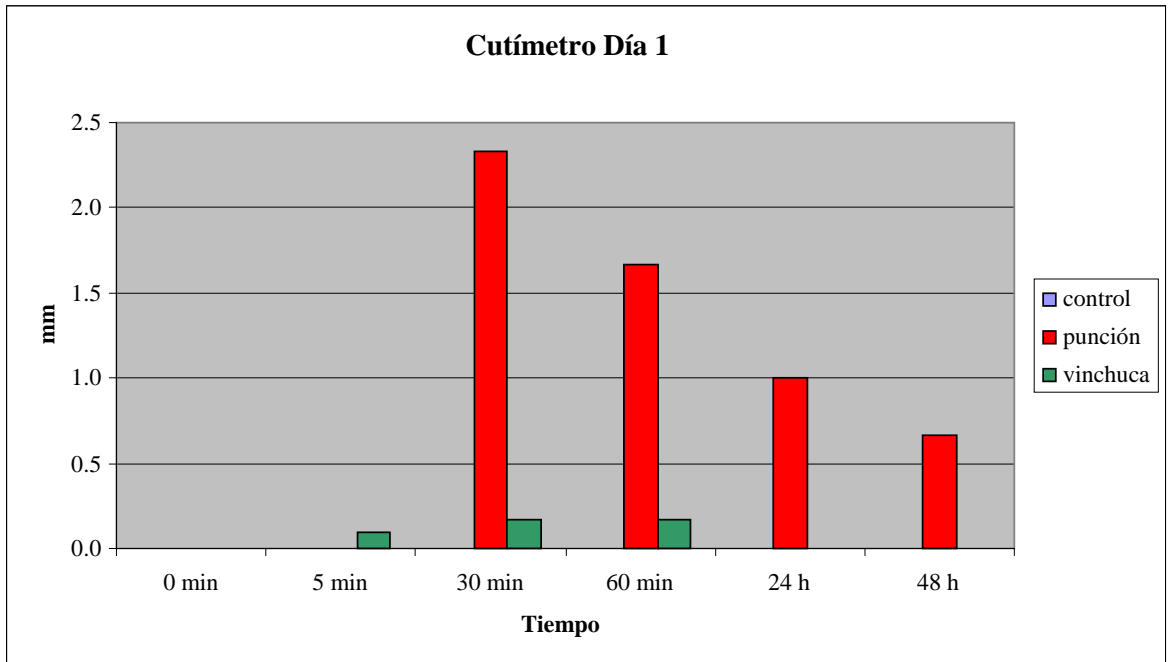
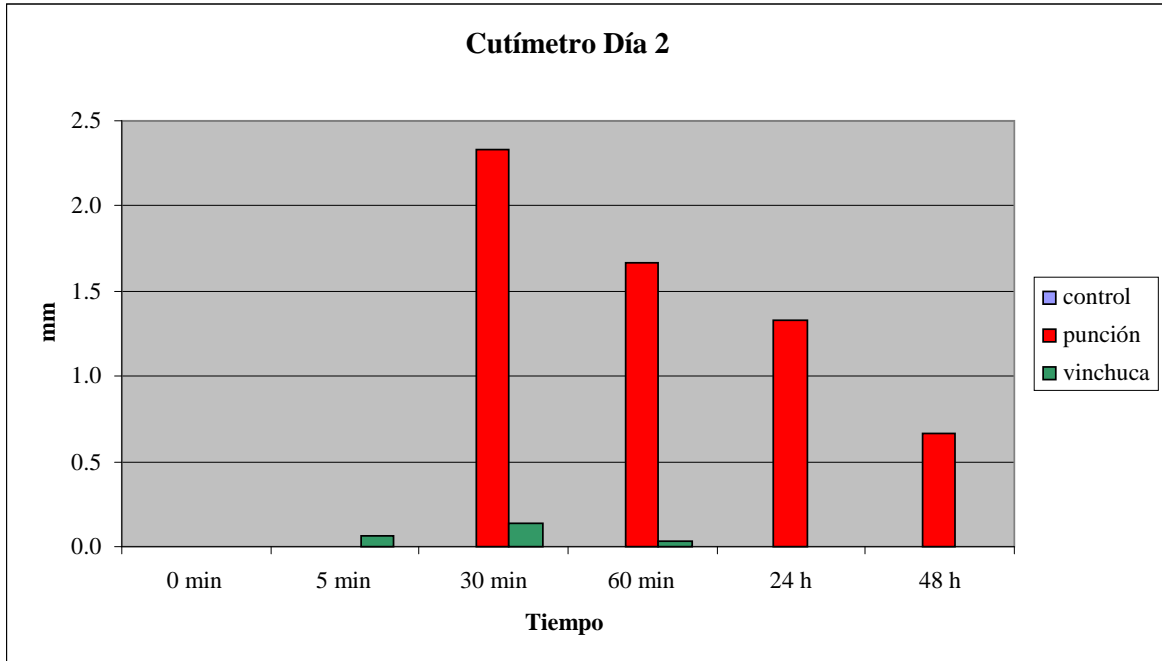
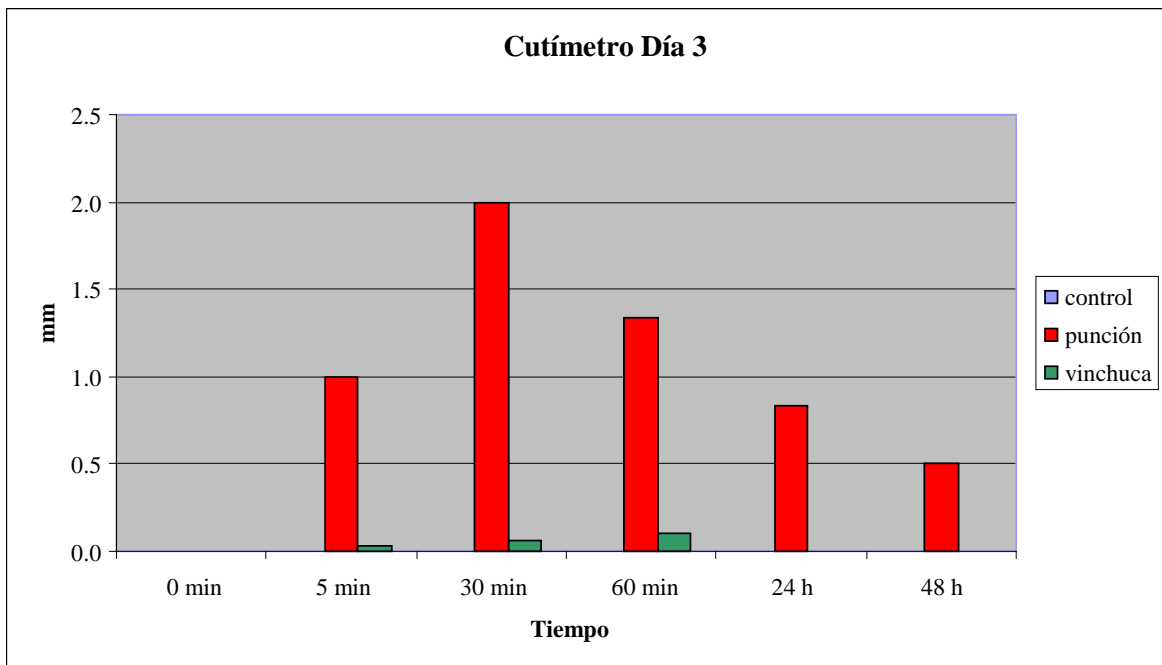


Gráfico 10

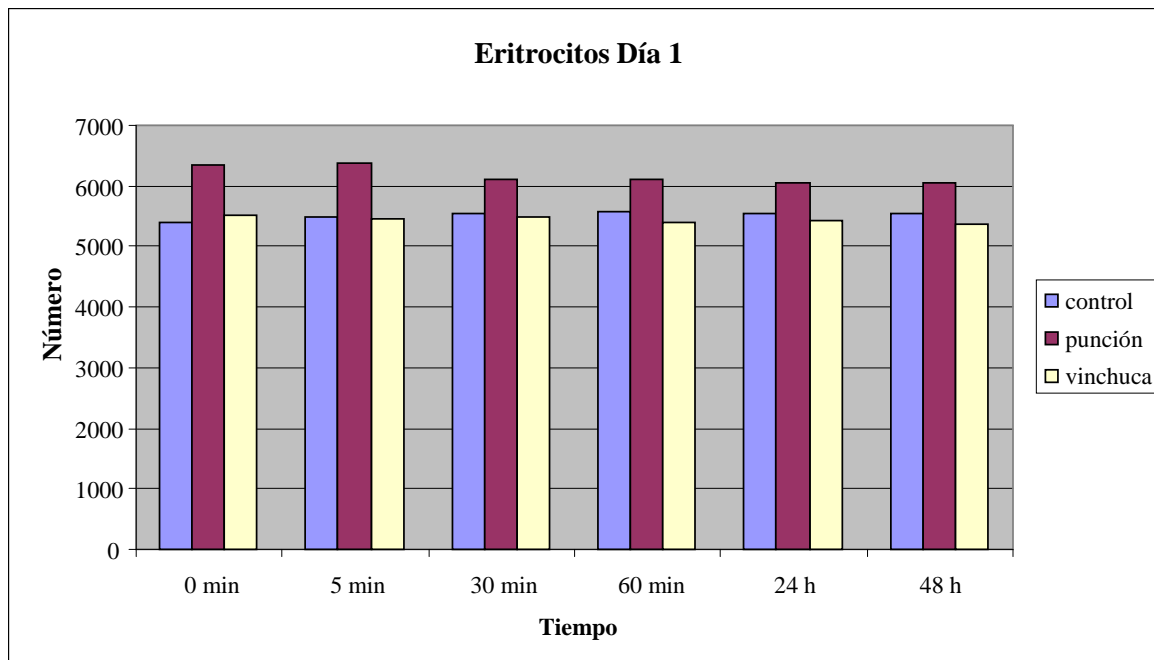


**Gráfico 11**

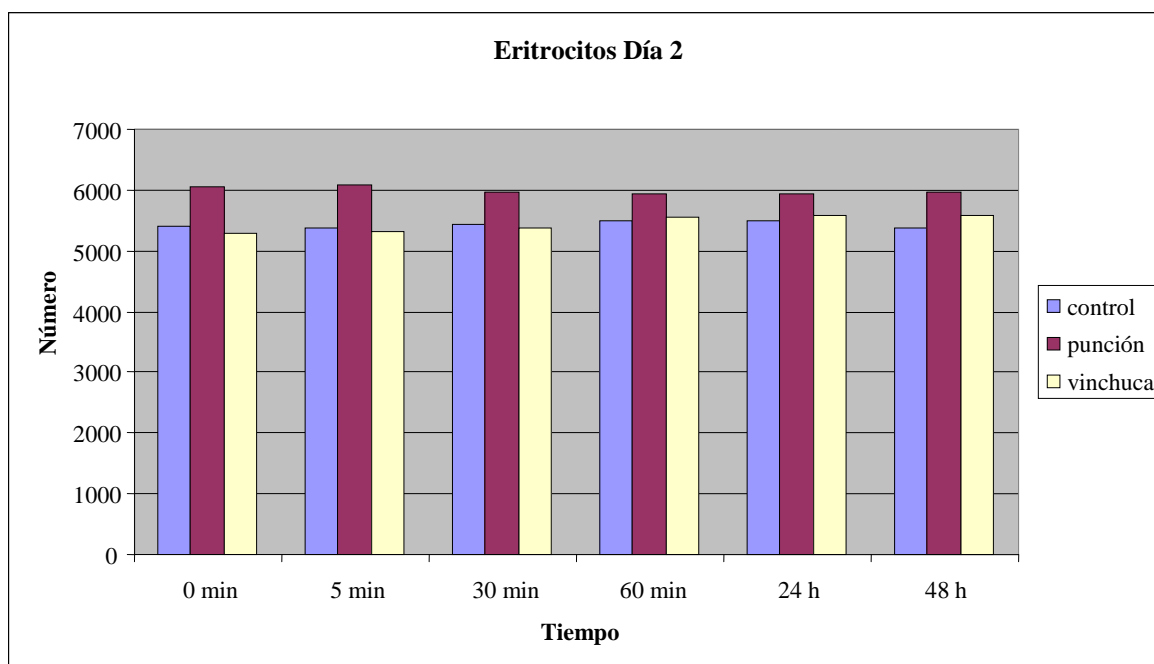


**Gráfico 12**

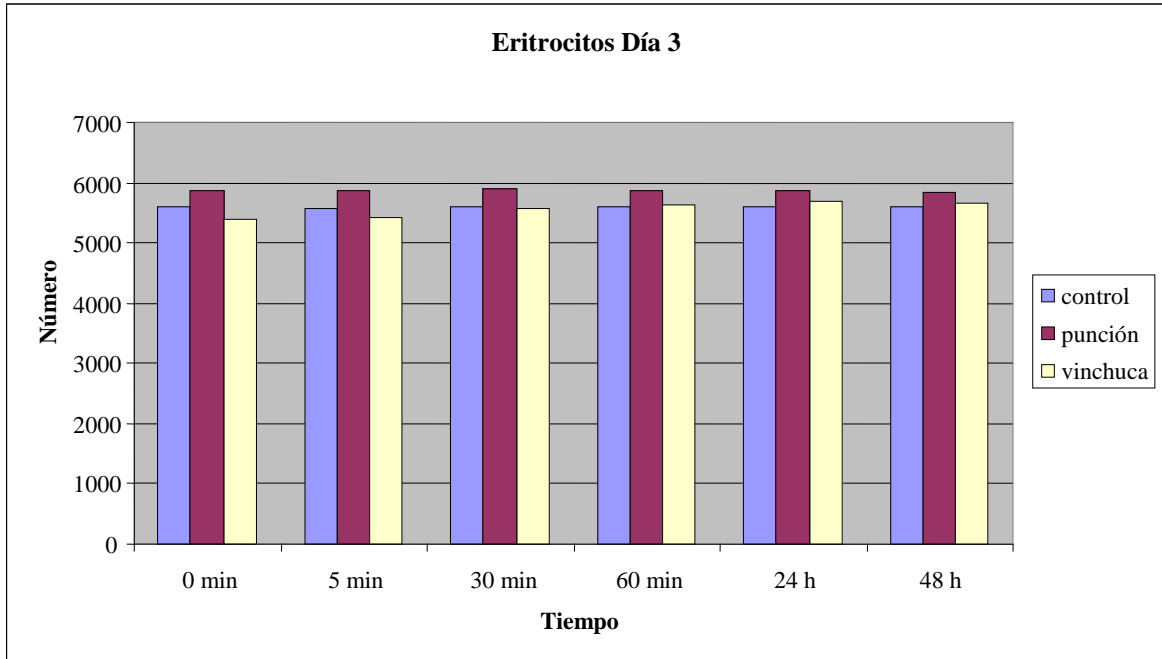
## Eritrocitos



**Gráfico 13**

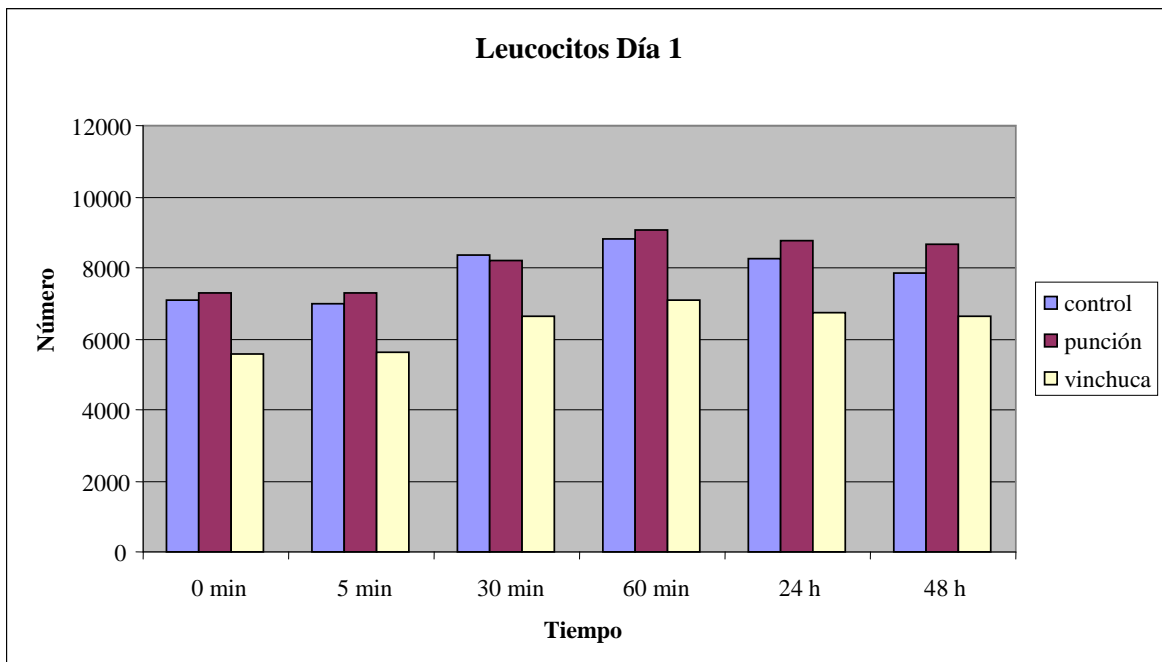


**Gráfico 14**



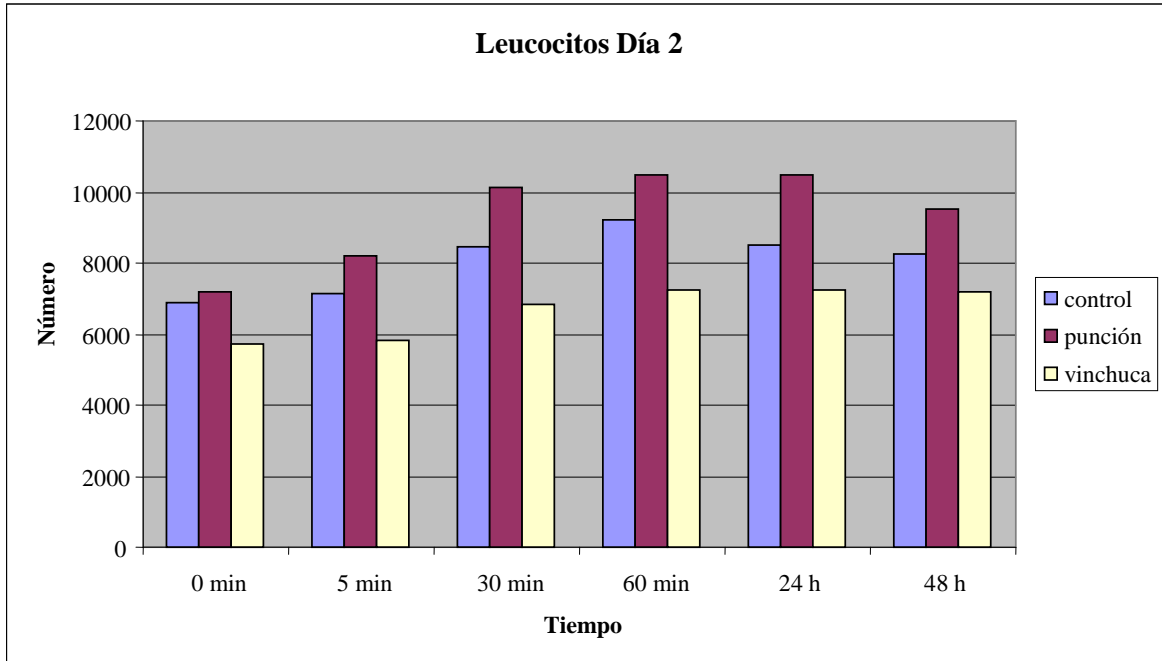
**Gráfico 15**

## Leucocitos

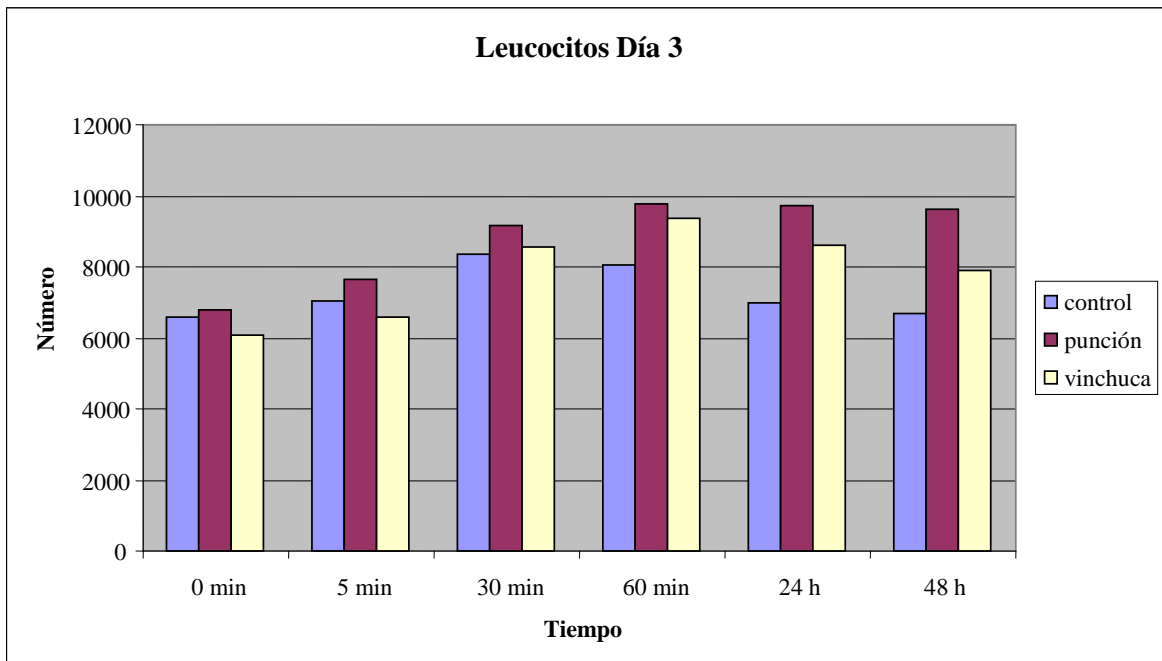


**Gráfico 16**



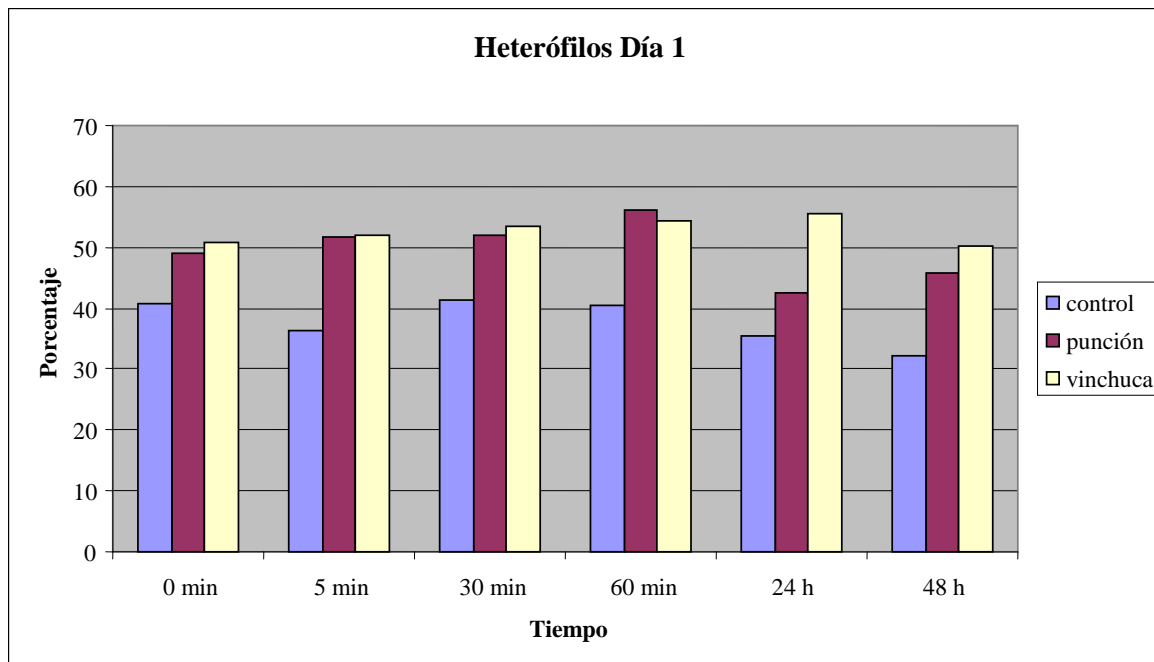


**Gráfico 17**

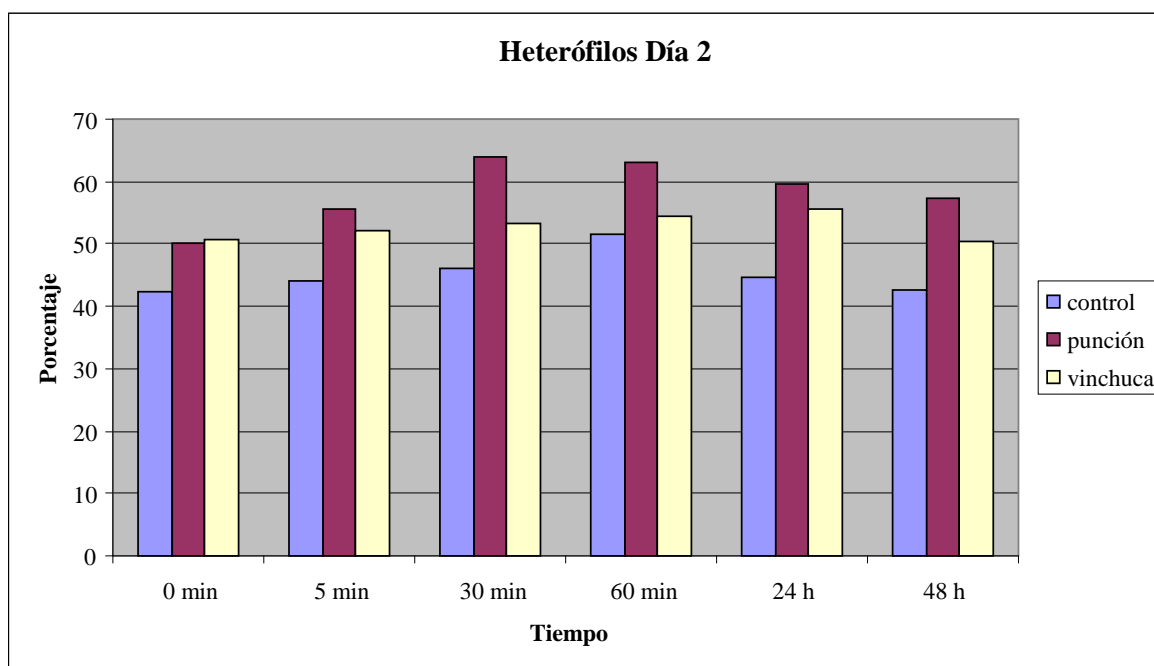


**Gráfico 18**

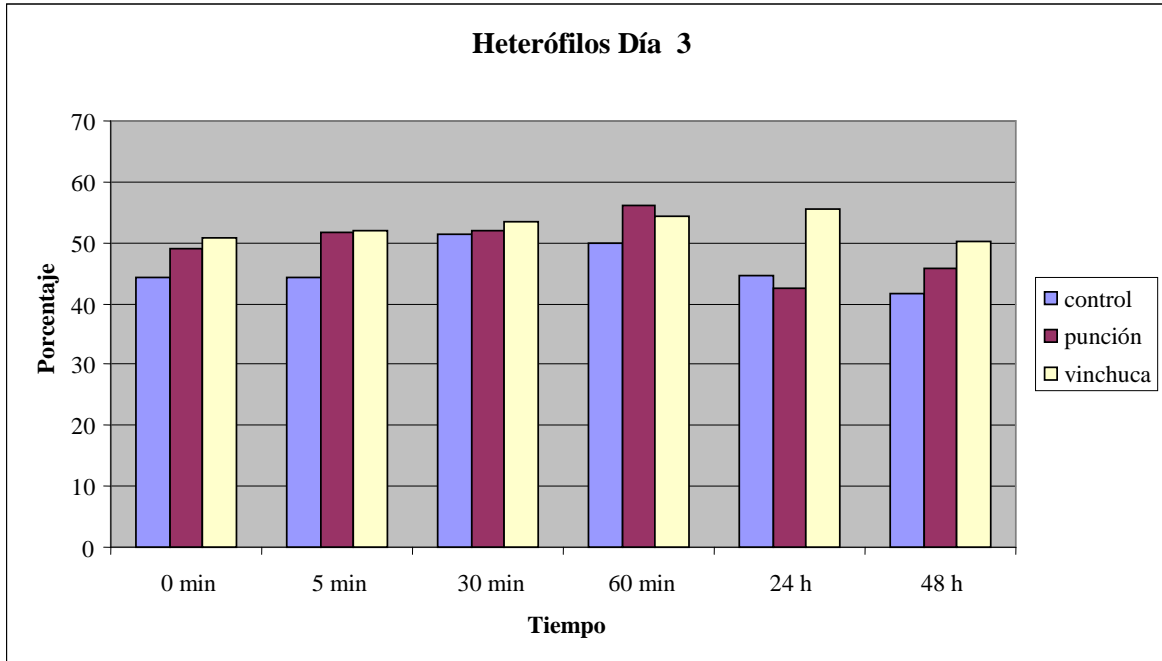
## Heterófilos



**Gráfico 19**

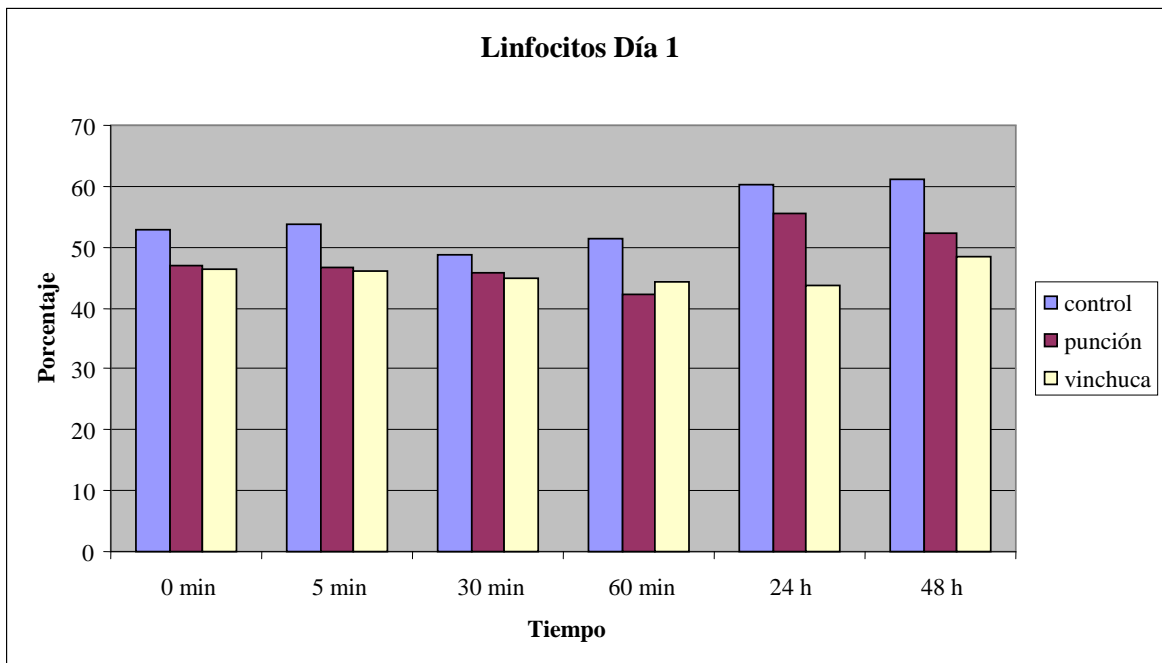


**Gráfico 20**



**Gráfico 21**

## Linfocitos



**Gráfico 22**

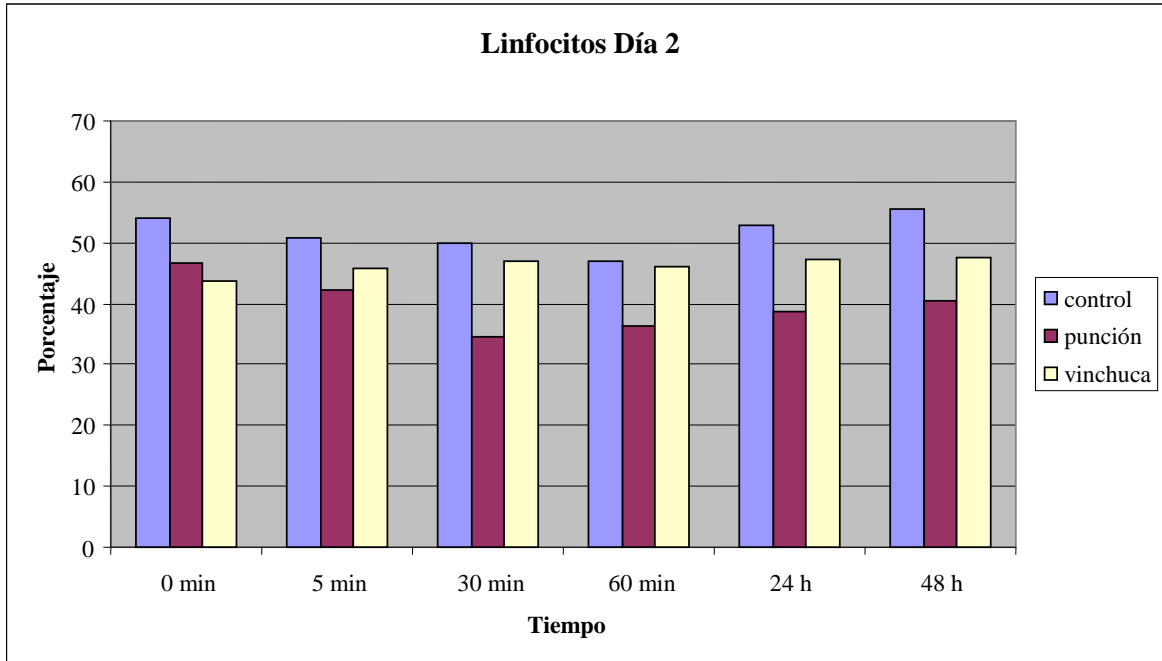


Gráfico 23

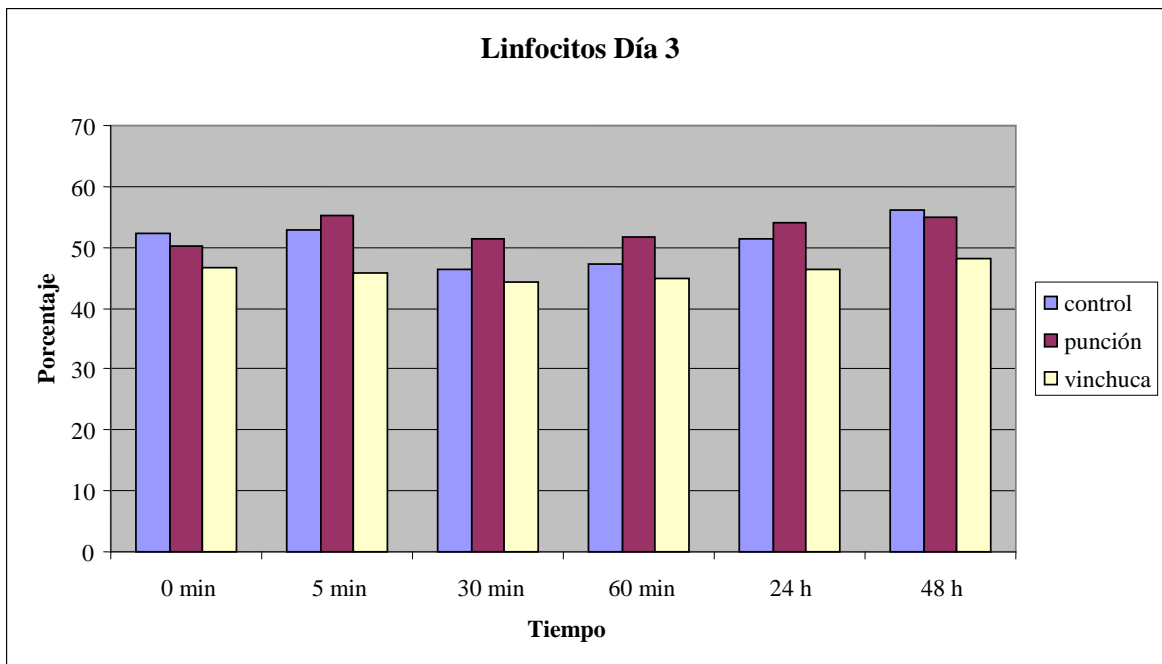
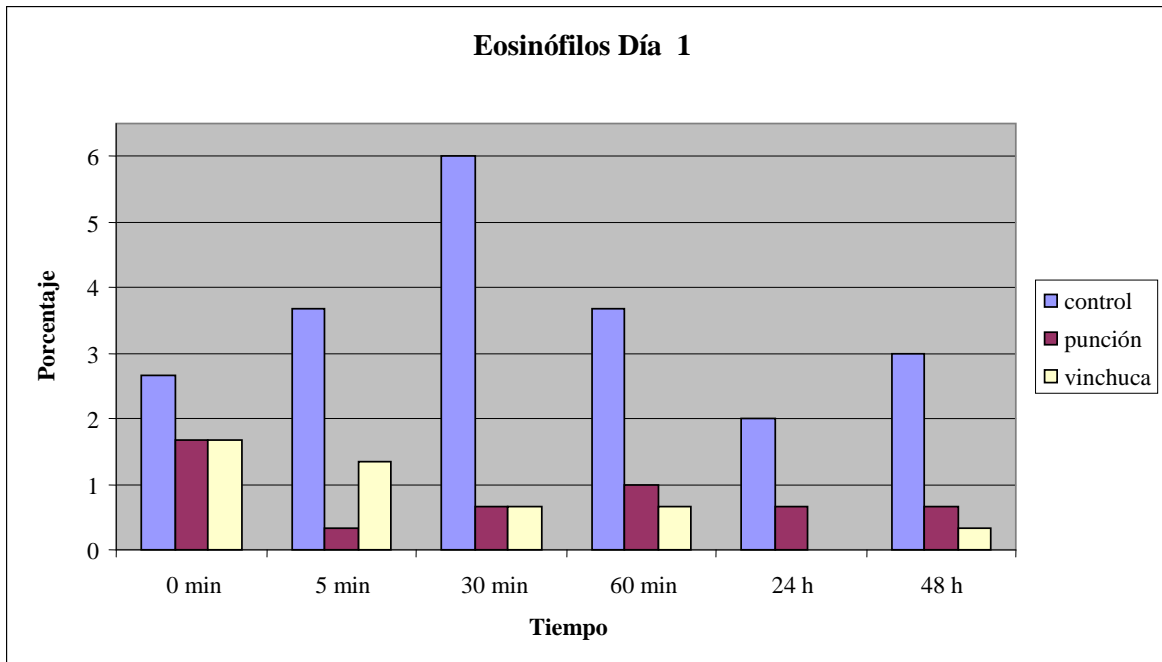
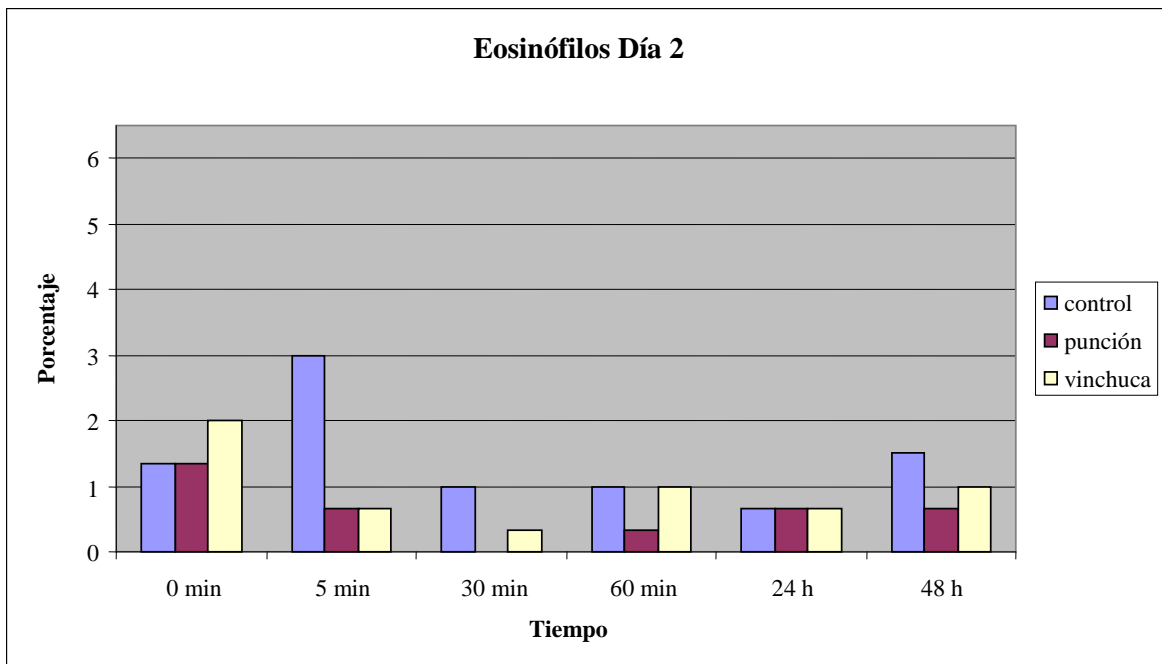


Gráfico 24

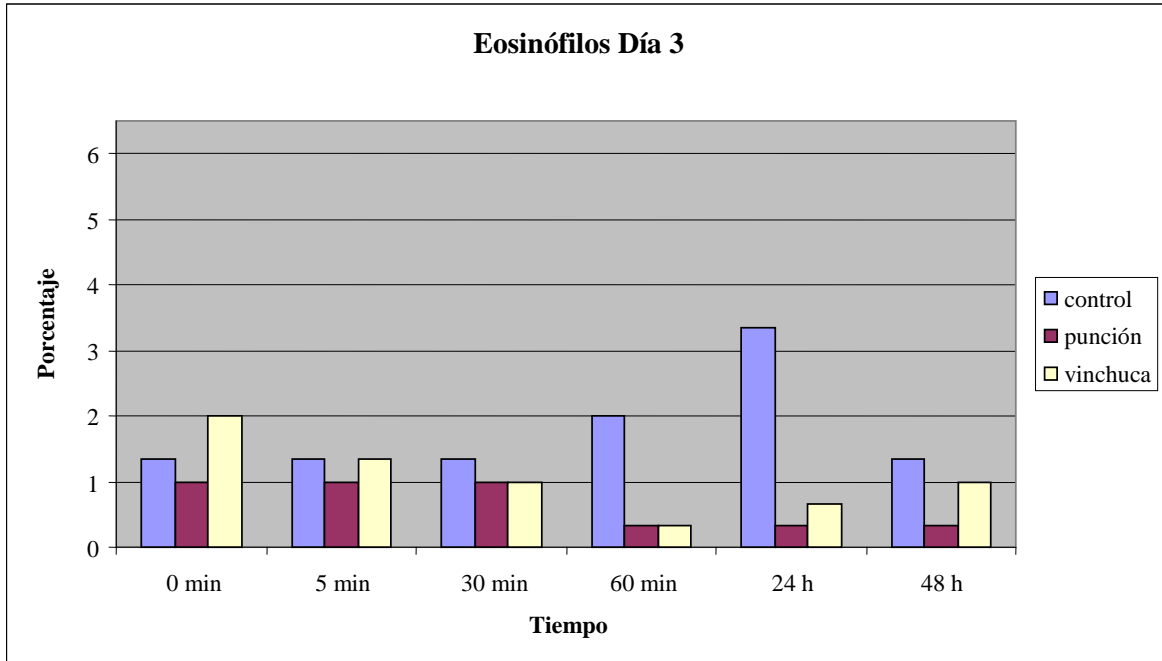
## Eosinófilos



**Gráfico 25**

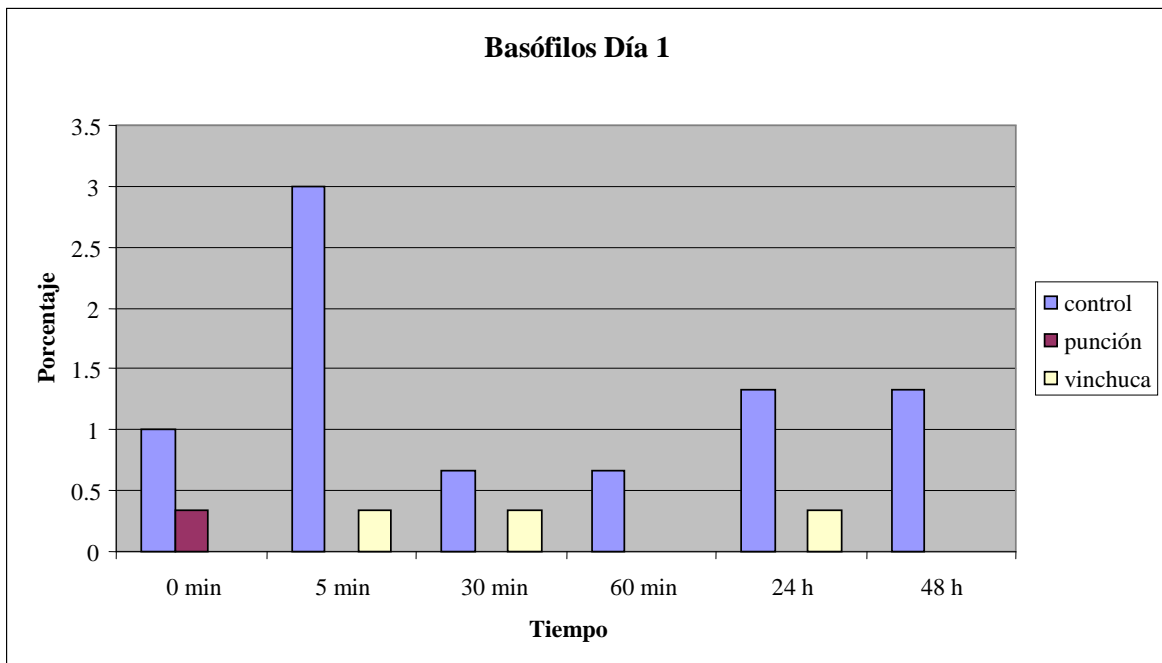


**Gráfico 26**

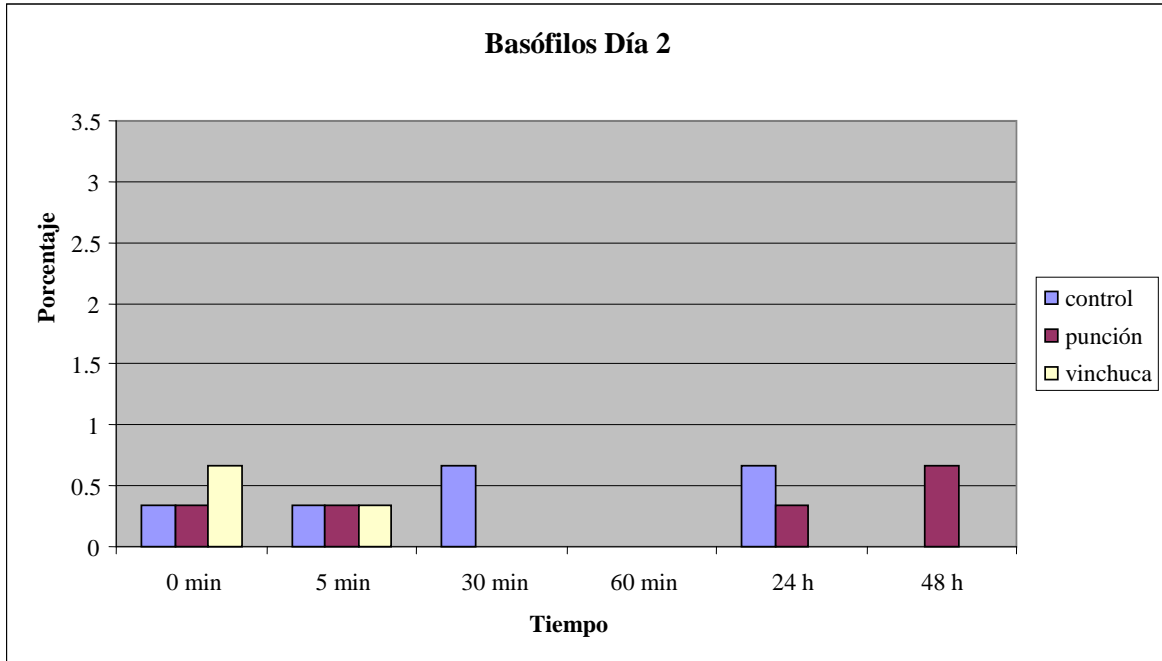


**Gráfico 27**

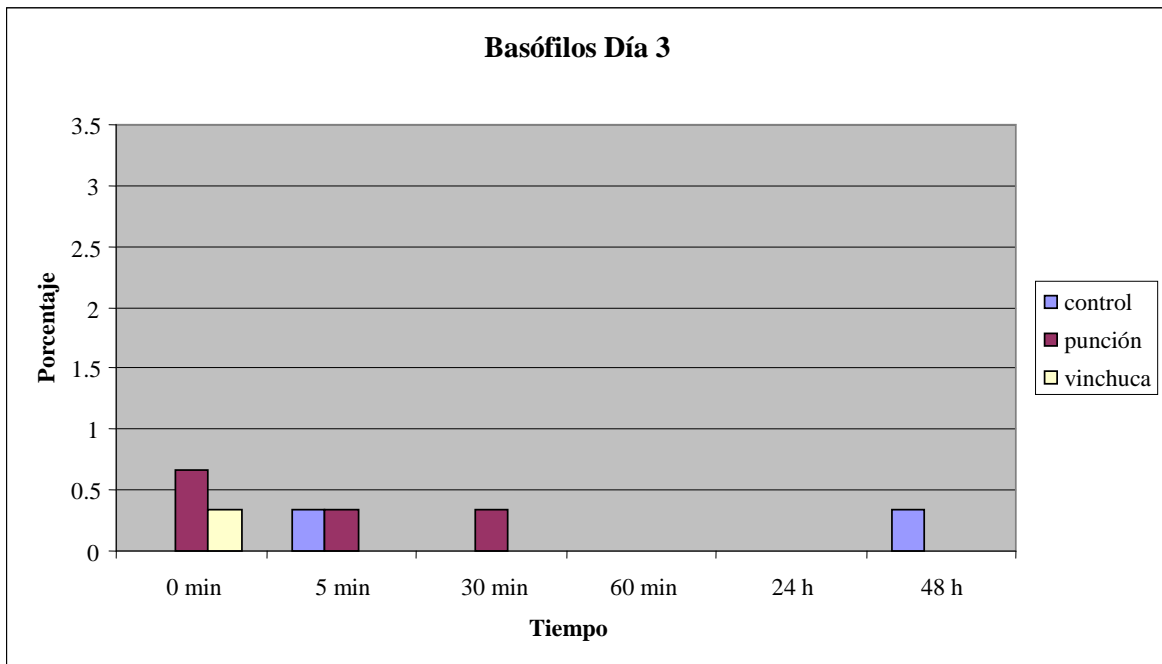
Basófilos



**Gráfico 28**



**Gráfico 29**



**Gráfico 30**

## Monocitos

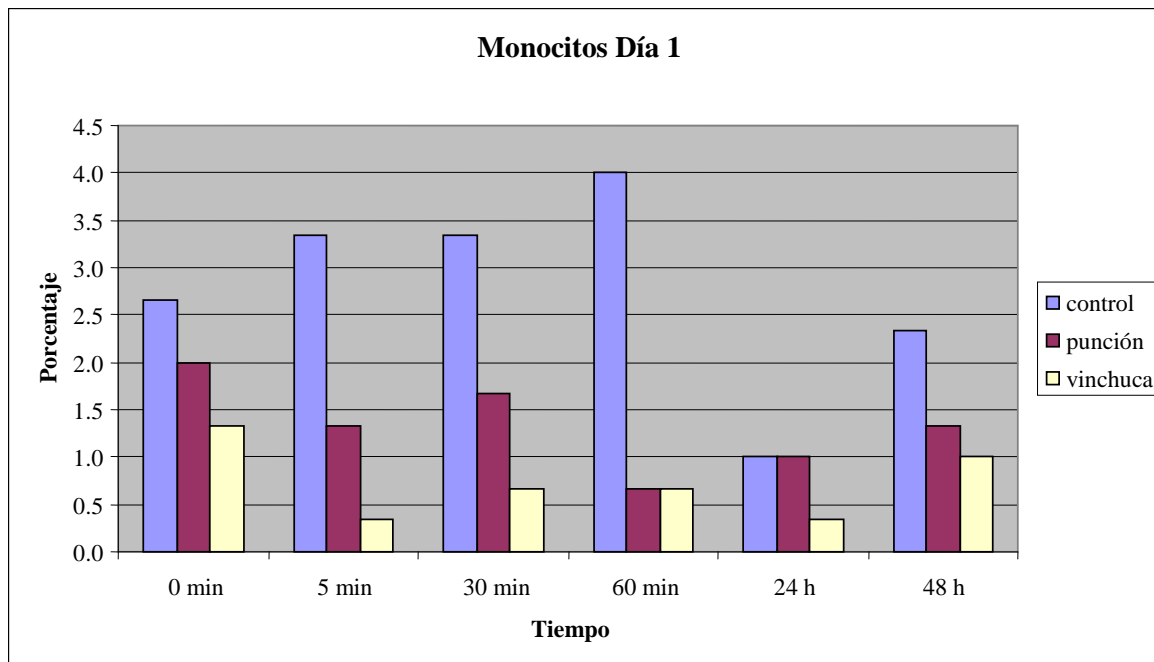


Gráfico 31

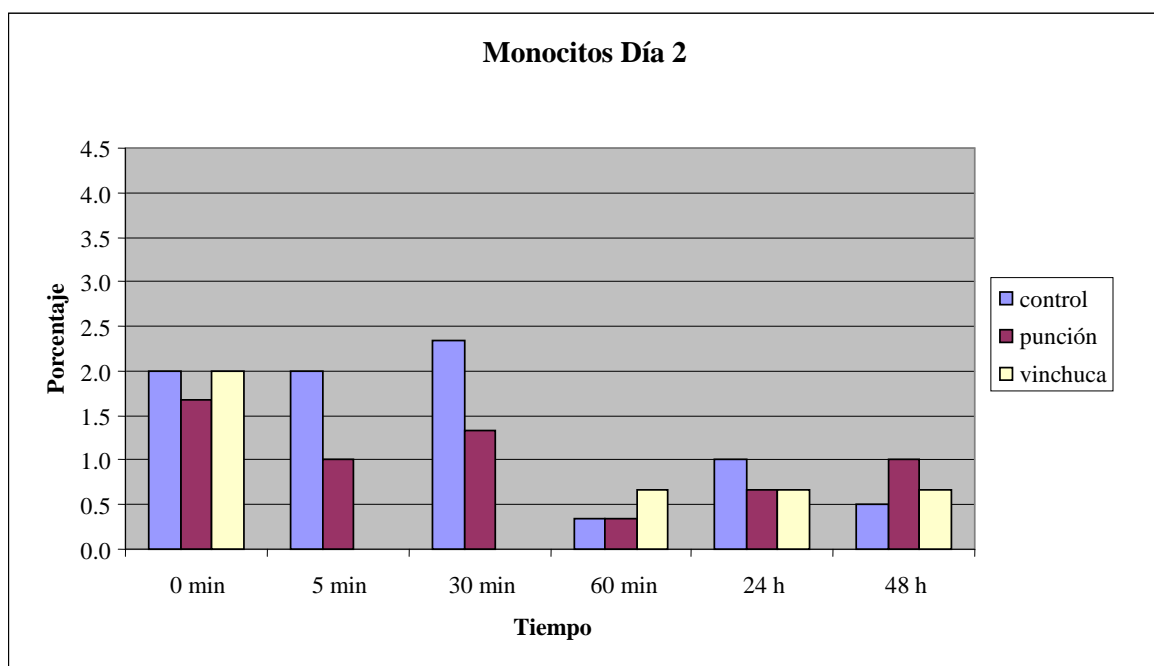
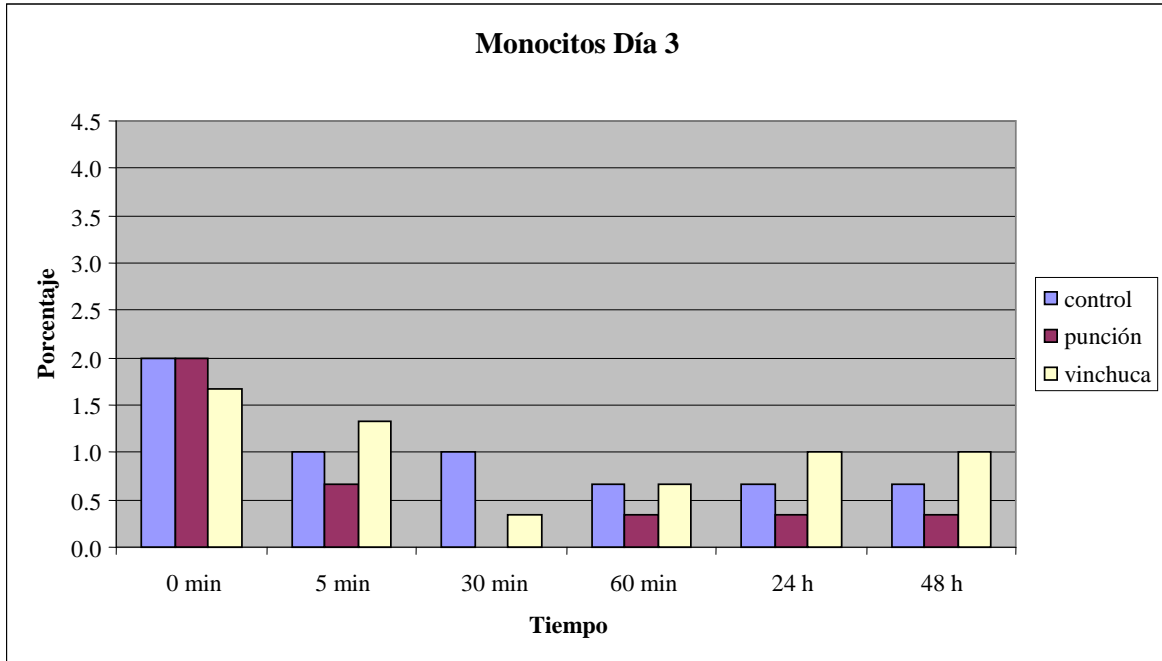


Gráfico 32





**Gráfico 33**