



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN EN DOS CEPAS PURAS DE  
RATONES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON  
*Trypanosoma cruzi*.

**PAULA PONZANO QUINTANAR**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: CLAUDIO ZÚÑIGA MARTI

SANTIAGO, CHILE  
2012

MEMORIA DE TÍTULO

**“EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN EN DOS CEPAS PURAS DE RATONES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Trypanosoma cruzi*”.**

**“COURSE OF INFECTION IN TWO STRAINS OF MICE EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Trypanosoma cruzi*”.**

**Paula Ponzano Quintanar\***

\* Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

## RESUMEN

La tripanosomiasis americana (o enfermedad de Chagas) es una enfermedad parasitaria endémica en Latinoamérica. Cerca de 8 millones de personas estarían infectadas con el agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*. En el presente trabajo experimental, se evaluaron dos grupos de ratones hembra, de las cepas A.Sw y CF1, infectados experimentalmente con el clon Dm28c de *T. cruzi*. Los resultados obtenidos demostraron que los ratones de la cepa A.Sw se comportaron como más resistentes que los de la cepa CF1, con mortalidades de 20% y 100%, respectivamente. Sin embargo, los animales A.Sw alcanzaron un mayor nivel de parasitemia.

Al aplicar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en varios tejidos, se observó que todos fueron positivos a la presencia de *T. cruzi*. Todas las muestras de tejido de los animales CF1 se mantuvieron positivas, mientras que algunas muestras de los ratones de la cepa A.Sw fueron negativas. El único tejido que permaneció positivo durante todo el estudio fue el cardíaco. Los resultados obtenidos implicarían que aplicación de la técnica de PCR en tejidos permite evidenciar la persistencia del parásito en animales supervivientes aún cuando la parasitemia es negativa.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, cepas de ratones, PCR.

## ABSTRACT

American trypanosomiasis (Chagas' disease) is an endemic parasitic disease in Latin America. About 8 million persons are infected with the aetiological agent, *Trypanosoma cruzi*. In this experimental work, two groups of female mice from A.Sw and CF1 strains, have been experimentally infected with clon Dm28c of *T. cruzi*. The results obtained showed that mice from A.Sw strain was more resistant than CF1 strain, with 20% and 100% of mortality, respectively. Although animals from A.Sw strain showed higher levels of parasitemia.

Applying polymerase chain reaction (PCR) technique in several tissues was observed that all samples have been positive to *T. cruzi*. All tissues remained positive in CF1 animals, and some samples were negative in animals from A.Sw strain. Only heart tissue remained positive throughout the study. The obtained results imply that PCR technique in tissues would allow show parasite persistence in survival animals even with negative parasitemia.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, mice strain, PCR.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, tiene una incidencia anual de 41.000 casos en América, y se estiman aproximadamente 8 millones de personas infectadas, provocando cerca de 12.000 muertes cada año (16).

Los vectores son insectos de la subfamilia *Triatominae*, siendo *Triatoma infestans* el principal y más difundido en el cono sur de Sud América (18). La infección se adquiere a través de sus deyecciones contaminadas con la forma infectante del parásito, que ingresa a través de la picadura, abrasiones de la piel o membranas mucosas intactas (12). Se describe que en animales domésticos y silvestres, la infección vía oral cobraría mayor importancia, al atrapar o masticar insectos infectados (15).

Los fenómenos de resistencia y susceptibilidad a la infección dependen, por un lado, de la variabilidad biológica de *T. cruzi* (26) y, por otro, del repertorio genético del hospedero en relación a los genes que codifican para moléculas involucradas en la defensa contra el parásito, como las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (26, 30).

*T. cruzi* presenta un marcado pleomorfismo; en mamíferos se encuentran en dos formas: tripomastigotes sanguíneos extracelulares y amastigotes intracelulares, en los tejidos. Mientras que en el vector se distinguen tres formas extracelulares; esferomastigotes en estómago, epimastigotes, en intestino medio, y tripomastigotes metacíclicos en intestino terminal (4).

En la enfermedad de Chagas se distinguen tres fases: fase aguda, con alta parasitemia; fase indeterminada, con baja parasitemia, debido a que se desencadena una respuesta inmune que hace que la infección se mantenga en focos determinados en los tejidos; y fase crónica, caracterizada por parasitemia ausente, y lesiones típicas en corazón o tracto digestivo (1,19).

*T. cruzi*, y otros miembros de la familia Trypanosomatidae se caracterizan por la presencia del kinetoplasto, una red fibrosa dentro de la mitocondria, que contiene cerca del 20% del ácido desoxirribonucleico (DNA) total del parásito (4). Está formada por maxicírculos (1,6 kpb) y minicírculos (1,4 kpb) de DNA. Existirían, al menos 50 copias idénticas de maxicírculos que codifican ácidos ribonucleicos (RNAs) ribosomales y proteínas involucradas en la generación de ATP. El número de minicírculos es variable, pudiendo tener entre 10.000 y 30.000 por célula. Están formados por cuatro regiones de secuencia altamente conservada, distribuidas regularmente cada 90°, con un tamaño de 120 pb, que representan los orígenes de

replicación de los minicírculos (6, 9), intercaladas por cuatro regiones hipervariables de un tamaño cercano a las 250 pb, al ser cuatro repeticiones por minicírculo se podrían tener entre 40.000 y 120.000 repeticiones diana de amplificación por parásito.

El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido la aplicación de PCR en el diagnóstico de la infección con *T. cruzi*, siendo más sensible que el xenodiagnóstico y hemocultivo. En esta técnica, se utilizan los primers 121 y 122, para amplificar fragmentos de DNA de 330 pb correspondientes a la región hipervariable y fracciones de la región constante de los minicírculos de *T. cruzi* (23).

Referente a los modelos biológicos utilizados en experimentación, el modelo murino es uno de los más difundidos para el estudio de la inmunidad, tanto celular como humoral ante la infección con *T. cruzi*. Adicionalmente, la existencia de cepas de ratones resistentes y susceptibles, ha permitido evidenciar la evolución de la infección y sus consecuencias patológicas (28, 29). Al respecto, la literatura señala que la cepa de ratones A.Sw es endogámica (*inbred*), y se comporta como resistente a la infección con *T. cruzi* (29). Por otra parte, la cepa de ratones CF1 es exogámica (*outbred*), representando una alta variabilidad genética, sin embargo, su comportamiento frente a la infección experimental con *T. cruzi* comparada con la cepa resistente A.Sw se desconoce.

Respecto al sexo de los animales, algunos estudios indican que ratones machos serían más susceptibles que ratones hembra (10), sin embargo, otros señalan que sólo difieren en el nivel de parasitemia alcanzado, a diferencia de lo que ocurre con ratas de la cepa F344 en la que mueren sólo machos infectados (22, 25).

*T. cruzi* presenta gran variabilidad intraespecífica en el aspecto bioquímico, inmunológico, genético y biológico (13) siendo capaz de invadir prácticamente cualquier órgano o tejido, sin embargo, es ampliamente reconocido que algunas cepas presentan una mayor tendencia a ubicarse preferentemente en algunas localizaciones (20). Actualmente, se diferencian dos linajes de *T. cruzi*: TCI, de ciclo silvestre y TC2, de ciclo doméstico, subdividido en 5 sub-grupos a, b, c, d y e (2). El representante del linaje I corresponde al clon Dm28c (8), que se comporta como altamente virulento en ratones de la cepa ACA infectados experimentalmente (25). Respecto a su histotropismo, estudios histopatológicos previos de la infección experimental en animales de la cepa BALB/c reveló el desarrollo de cardiomiopatía, miocarditis aguda y miositis, con múltiples pseudoquistes en fibras cardíacas y músculo esquelético (17), lo que concuerda con los resultados de Pizzi *et al* (21), en que se evaluó

histopatológicamente el comportamiento de dos poblaciones de *T. cruzi* pertenecientes también al linaje I, en varios órganos, entre los cuales estaba cerebro, timo, pulmón, corazón, bazo, riñón, hígado, intestino delgado, piel y músculo esquelético. Las lesiones inflamatorias se encontraron preferentemente en músculo esquelético y en menor proporción en miocardio auricular, sin embargo, el resto de los órganos y tejidos examinados no reveló la presencia de parásitos ni lesiones inflamatorias. Lo que revela la importancia de confirmar la concordancia de los hallazgos histológicos en poblaciones provenientes de distintos transmisores y zonas geográficas, cuyo único factor común es pertenecer al mismo linaje (21).

El objetivo de este trabajo de investigación consiste en analizar la evolución de la infección experimental con el clon Dm28c de *T. cruzi*, que se encuentra en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, en dos cepas de ratones, A.Sw y CF1. A través de la evaluación y comparación de los niveles de parasitemia y mortalidad, relacionándolos con la presencia de parásitos intracelulares en distintos tejidos (corazón, riñón, cerebro, hígado, músculo esquelético del miembro posterior e intestino grueso), utilizando la técnica de PCR convencional.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

### **1. Cepas de parásitos**

Se utilizaron tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi* (7). Este parásito se mantiene por pasajes sucesivos en ratones BALB/c, en el Bioterio de la Unidad de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

### **2. Ratones**

Se emplearon dos grupos de 15 hembras de 10 semanas de edad cada uno, correspondientes a las cepas A.Sw y CF1. Ambos grupos se inocularon intraperitonealmente (i.p.) con aproximadamente 2.000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* (25), contenidos en 0,2 mL de una dilución de sangre infectada de ratones BALB/c, contados al microscopio con cámara de Neubauer (30).

La cepa A.Sw proviene originalmente de Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, U.S.A., mientras que las cepas CF1 (11) y BALB/c fueron adquiridas en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Además se utilizaron dos grupos controles de 5 hembras

de 10 semanas de edad, de ambas cepas de ratones. Cada ratón fue inoculado con 0,2 mL de una dilución de sangre de animales sanos BALB/c, para descartar los posibles efectos adversos inducidos por las sucesivas sangrías y/o la inoculación con sangre extraña BALB/c.

### **3. Estudio de Parasitemia**

Con el fin de determinar prepatencia y niveles de parasitemia, los animales infectados fueron sangrados desde la vena caudal, al tercer día postinfección (p.i) y, posteriormente, día por medio hasta que la parasitemia fue negativa.

La sangre fue recolectada en tubos de microhematocrito heparinizados y centrifugada a 700 g por 5 minutos, dejándola incubar por 30 minutos a temperatura ambiente (25°C), para luego determinar el volumen de cada muestra. Finalmente, se expresó la cantidad de parásitos por mL en cada ratón, de acuerdo al método descrito por Arias y Ferro (3). Los resultados fueron expresados como el promedio de parasitemia del grupo más la desviación estándar correspondiente.

Para el análisis estadístico se consideró el promedio del día de máxima parasitemia en cada grupo de ratones, y se utilizó la prueba estadística de Mann y Whitney para muestras independientes ( $p < 0,05$ ) para establecer si las diferencia entre ambas fue estadísticamente significativa.

### **4. Técnica de PCR convencional**

Para realizar PCR convencional de tejido, los animales fueron sacrificados los días 14, 27 y 100 p.i. para la cepa A.Sw, y días 14 y 27 p.i. para los ratones de la cepa CF1, debido a que no sobrevivieron hasta el día 100 p.i. Se extrajeron muestras de hígado, cerebro, corazón, riñón, intestino grueso y músculo esquelético del miembro posterior (bíceps femoral), de cada uno de los ratones sacrificados.

Como control positivo, se utilizaron dos muestras de tejido cardiaco de ratón, que arrojaron resultado positivo, pertenecientes al Laboratorio de Parasitología Occidente de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Y como control negativo, se utilizó tejido cardiaco de dos de los ratones de cada grupo control.

#### 4.1 Extracción DNA

Para la obtención de DNA de *T. cruzi* a partir de los órganos de ratón, se obtuvieron trozos de 25 mg de cada tejido evaluado, que fueron depositados en tubos eppendorf y lavados con PBS pH 7,2. El material quirúrgico fue lavado y posteriormente sumergido en solución de hipoclorito de sodio 1% (24) Posteriormente se agregaron 100 µL de tampón ATL y 20 µL de proteinasa K, se maceró con una bagueta e incubaron a 56°C toda la noche.

Al día siguiente, se agregaron 200 µL de buffer AL, y se agitó por 15 segundos. Para incubar a 70°C por 10 minutos. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas en microcentrífuga CAPSULE TOMY HF-120, y se les agregaron 200 µL de etanol 100. La extracción se realizó de acuerdo al protocolo del Kit QIAamp® (Lab. QIAGEN, Miami-USA).

#### 4.2 Amplificación

El DNA obtenido a partir del proceso previo de extracción, se agregó a tubos de PCR que contenían el Master Mix, constituido por 10x buffer; dATP, dCTP, dGTP y dTTP 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; *Taq* DNA Polimerasa (2,5 U/µL); oligonucleótidos 121 (5`-AAA TAA TGT ACG GGG GAG ATG CAT GA-3`) y 122 (5`-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3`) 0,5 µM y H<sub>2</sub>O bidestilada.

Posteriormente, los tubos de PCR con 80 µL de Master Mix y 20 µL de muestra, se introdujeron en un Termociclador Minicicler (Lab. M.J. Research, USA), programado con 1 ciclo de 94°C/5min - 40 ciclos de 94°C/20 seg - 57°C/10 seg - 72°C/10 seg y un ciclo final de 72°C/7 min.

#### 4.3 Electroforesis

Para revelar la presencia de ADN, 15 µL de los amplificados se mezclaron con tampón de corrida de PCR (glicerol 30%, azul de bromofenol 0,25%, xileno-cianol 0,25% y H<sub>2</sub>O bidestilada cantidad suficiente para 100 mL). Los amplificados fueron sometidos a electroforesis por una hora en cámara Modelo M6U-402T a 110 Volts en gel de agarosa al 2%, embebido en buffer TBE (Tris/borato/EDTA pH 8,3) y 10 µL de Bromuro de etidio. Se utilizó 1 Kb DNA Leader, como marcador de peso molecular.



#### 4.4 Revelado

Para identificar las 330 pb del ADN de la región hipervariable del kinetoplasto de *T. cruzi*, el gel de corrida fue observado bajo transiluminador TFP-10M (Vilbes Lourmat), fotografiando todos los revelados.

### 5. Bioseguridad

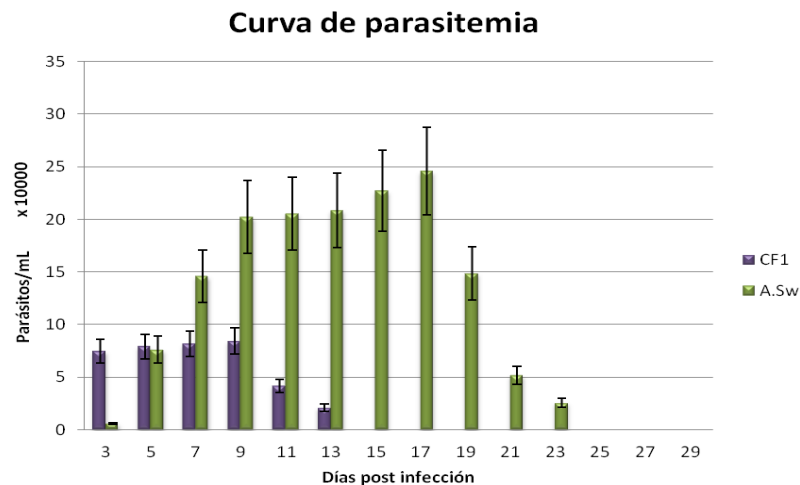
La inoculación de los animales experimentales y utilización de jeringas con material contaminado, fue realizada por el profesor guía. Posteriormente, los animales fueron sangrados en una campana de bioseguridad, con guantes de látex grueso, antiparras y mascarilla, supervigilados por el profesor guía.

Los ratones fueron sacrificados por inhalación de CO<sub>2</sub>. Los cadáveres se eliminaron en bolsas plásticas selladas y congeladas a -18°C, y luego fueron cremados.

La manipulación y eliminación del material contaminado, utilizado con los ratones y en PCR, fue realizada bajo el protocolo de normativa de la Unidad de Bioseguridad de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Según los resultados obtenidos en base a la evaluación de la parasitemia, se estableció que el periodo de prepatencia en sangre fue de 3 días para ambos grupos. En el Gráfico 1 se muestra el desarrollo de la infección en los animales CF1 y A.Sw infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm 28c de *T. cruzi*. La cepa A.Sw presentó una media máxima de parasitemia de  $2,4 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^3$  parásitos/mL al día 17 p.i., mientras que la cepa CF1 obtuvo una media máxima de  $8,4 \times 10^4 \pm 5,0 \times 10^3$  parásitos/mL el día 9 p.i. La diferencia entre ambos resultó ser estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). En el caso de los animales A.Sw, la parasitemia fue evidente hasta el día 23 p.i., mientras que en el caso de los animales CF1 fue sólo hasta el día 13 p.i.

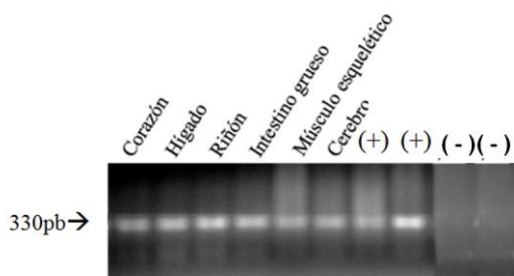


**Gráfico 1.** Niveles de parasitemia en dos cepas puras de ratones (CF1 y A.Sw), infectadas con 2.000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*, expresadas como número de parásitos por ml (x10.000) y días p.i.

La mortalidad se analizó de manera descriptiva y, considerando que todos los animales se infectaron efectivamente, éste parámetro se utilizó como aproximación a la susceptibilidad. De tal manera, en los ratones de la cepa CF1 al día 18 p.i. se observó un 20% de mortalidad, pero al día 28 p.i. murió el 100%. Mientras que en los animales de la cepa A.Sw, se observó un 20% de mortalidad al día 23 p.i., y los animales supervivientes se mantuvieron hasta los 6 meses p.i., a pesar de que inicialmente mostraron decaimiento y pelo erizado, aparentemente logran recuperar su estado inicial. Lo que implica que, en esta situación experimental, los ratones de la cepa A.Sw se comportaron como menos susceptibles a la patogenicidad del clon Dm28c de *T. cruzi*, que los animales de la cepa CF1.

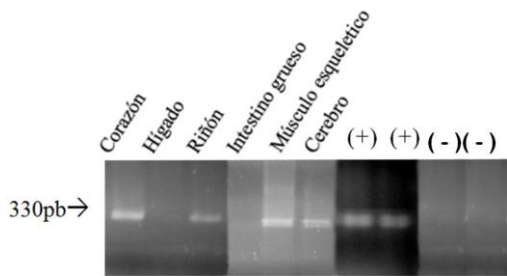
En este estudio, la cepa A.Sw presentó mayores niveles de parasitemia que la cepa susceptible CF1. Estos resultados coinciden con resultados anteriores, de los que se desprende que no existiría una relación directa entre los niveles de parasitemia alcanzados y la susceptibilidad o resistencia a la infección (14, 28, 29). En relación a lo anterior se ha demostrado que ratones infectados con *T. rangeli*, tripanosoma no virulento, pueden alcanzar niveles de parasitemia mayores que con *T. cruzi* (27). Al respecto, la literatura sugiere que existirían otros mecanismos involucrados, probablemente de naturaleza autoinmune (5).

Según los resultados obtenidos al aplicar la técnica de PCR convencional, la totalidad de las muestras de los ratones CF1 evidenciaron la presencia de kDNA de *T. cruzi* en todos los órganos evaluados, tanto en las muestras obtenidas el día 14 como en las del día 27 p.i. (Figura 1).



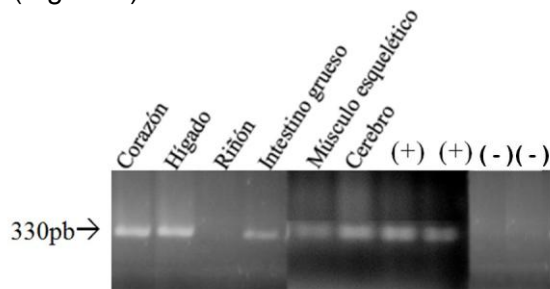
**Figura 1** Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR, obtenidos de los tejidos de ratones CF1 al día 14p.i., idénticos a los de día 27 p.i. (datos no mostrados), según el protocolo del “Kit” QIAamp® blood (Lab. QIAGEN, Miami-USA), observadas bajo transiluminador TFP-10M (Vilbes Lourmat).

Por otra parte, las muestras de los animales de la cepa A.Sw evidenciaron la presencia del parásito en todos los tejidos, excepto intestino grueso e hígado, en uno de los dos ratones sacrificados el día 14 p.i. (Figura 2).



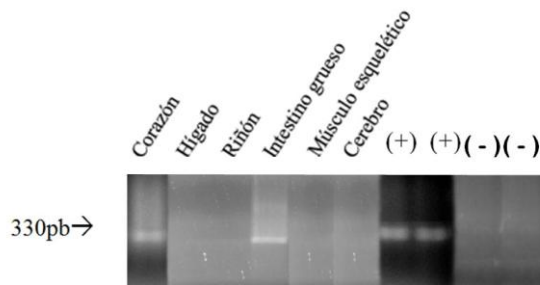
**Figura 2** Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR, obtenidos de las muestras de ratones A.Sw al día 14 p.i., según el protocolo del “Kit” QIAamp® blood (Lab. QIAGEN, Miami-USA), observadas bajo transiluminador TFP-10M (Vilbes Lourmat).

En los ratones de la cepa A.Sw, sacrificados al día 27 p.i. sólo riñón resultó negativo a la presencia de *T. cruzi* (Figura 3).



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR, obtenidos de las muestras de ratones A.Sw al día 27 p.i., según el protocolo del “Kit” QIAamp® blood (Lab. QIAGEN, Miami-USA), observadas bajo transiluminador TFP-10M (Vilbes Lourmat).

Finalmente, al día 100 p.i. muestras de riñón, músculo esquelético, cerebro e hígado fueron negativas en uno de los dos ratones sacrificados del grupo superviviente de la cepa A.Sw (Figura 4).



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR, obtenidos de las muestras de ratones A.Sw al día 100 p.i., según el protocolo del “Kit” QIAamp® blood (Lab. QIAGEN, Miami-USA) observadas bajo transiluminador TFP-10M (Vilbes Lourmat).

Sin embargo, las muestras de corazón obtenidas de los ratones de la cepa A.Sw se mantuvieron positivas a la presencia de *T. cruzi* durante todo el ensayo, lo que coincide con el tropismo por el tejido cardíaco del linaje I, descrito por la literatura (17).

Los resultados anteriores demuestran que el parásito permanece en forma latente en el individuo infectado, a pesar de que la parasitemia sea negativa (fase crónica), como ocurrió con los animales de la cepa A.Sw, lo que implicaría que nunca existe una resolución total de la infección.

La Figura 5 resume los resultados obtenidos con la técnica de PCR en todas las muestras obtenidas en las dos cepas de ratones, en los días 14, 27 y 100 p.i.

Días post-infección	14		27	
	1	2	3	4
Ratón CF1(N)				
Órgano				
Corazón	+	+	+	+
Hígado	+	+	+	+
Riñón	+	+	+	+
Intestino grueso	+	+	+	+
Músculo esquelético	+	+	+	+
Cerebro	+	+	+	+

Días post-infección	14		27	100	
	1	2	3	4	5
A.Sw (N)					
Órgano					
Corazón	+	+	+	+	+
Hígado	-	+	+	+	-
Riñón	+	+	-	+	-
Intestino grueso	-	+	+	+	+
Músculo esquelético	+	+	+	+	-
Cerebro	+	+	+	+	-

**Figura. 5** Tabla resumen de los resultados de la aplicación de la técnica de PCR, en los distintos órganos evaluados en los ratones de las cepas CF1 y A.Sw, infectados con *T. cruzi*.

## CONCLUSIONES

- La cepa de ratones CF1 presentó una mayor mortalidad (100%) que la cepa A.Sw frente a la infección con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*.
- El nivel de parasitemia alcanzado por los animales infectados no se relacionó con la mayor o menor susceptibilidad a la infección con el parásito, puesto que los animales de la cepa A.Sw, alcanzaron mayor nivel de parasitemia que los de la cepa CF1.
- Todos los órganos muestreados de las dos cepas de ratones, evidenciaron la presencia de *T. cruzi* mediante la técnica de PCR.
- En la cepa CF1 se obtuvieron resultados positivos en todos los tejidos analizados durante todo el periodo de estudio, mientras que en la cepa A.Sw, intestino grueso, riñón, hígado, músculo esquelético y cerebro, evidenciaron resultados negativos en alguna oportunidad.
- Al aplicar la técnica de PCR convencional, el único órgano que permaneció siempre positivo fue corazón, tanto para la cepa de ratones CF1 como para A.Sw.
- En los tejidos evaluados de los animales A.Sw supervivientes, se evidenció la presencia de parásito, aún cuando la parasitemia fue negativa al día 100 p.i., lo que implicaría la persistencia del parásito, al menos, durante todo el periodo de estudio.

## REFERENCIAS

1. **ACHA, P.; SZYFRES, B.** 2003. Sección A: Protozoonosis, Enfermedad de Chagas **En:** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ª ed. Washington, D.C.: OPS: OMS. Vol 3, pp 27-38.
2. **APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, I.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; NOEMÍ, I.; SAN MARTÍN, A.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I.** 2008. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas. Parte I. Introducción y epidemiología. Rev Chil Infect 25 (3): 189-193
3. **ARIAS, A.; FERRO, E.** 1988. Quantification of *Trypanosoma cruzi* parasitemia by direct micromethod. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 82: 248.
4. **BOTERO, D.; RESTREPO, P.** 2008. Parasitosis Humanas. Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín, Colombia, pp 19-206.
5. **BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.** 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. Int Arch Allergy Immunol 114: 103-110.
6. **BRITTO, C.** Variabilidad genética del kADN aplicada a estudios de epidemiología molecular de la enfermedad de Chagas. Mem Inst Oswaldo Cruz 21040-900 [en línea] <[http://www.fiocruz.br/chagas\\_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=75](http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=75)> [consulta: 9 Diciembre 2010].
7. **CONTRERAS, V.; ARAUJO-JORGE, T.; BONALDO, M.; THOMAZ, N.; BARBOSA, H.; MEIRELLES, M.; GOLDENBERG, S.** 1988. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem Inst Oswaldo Cruz 83: 123-133.
8. **DEGRAVE, W.** El genoma. Mem Inst Oswaldo Cruz 21040-900 [en línea] <[http://www.fiocruz.br/chagas\\_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=71](http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=71)> [consulta: 20 Agosto 2010].
9. **FERRER, E.; DA CONCEICAO, F.; CAMPIOLI, P.; LARES, M.; LÓPEZ, M.; RIVERA, M.; VIETTRI, M.; MEDINA, M.; SALCEDO, M.; MOROCOIMA, A.; HERRERA, L.** 2009. Validación de protocolos de PCR para el diagnóstico molecular de la Enfermedad de Chagas. Salus online Sup.1 Biología molecular 12: 163-174.
10. **HAUSCHKA, T.** 1947. Sex of the host as factor in Chagas disease. J Parasitol 33: 399-405.
11. **KLEIN J.; FIGUEROA F.; CHELLA S.** 1983. H-2 Haplotypes, genes and antigens: second listing. Immunogenetics 17: 553-596.

12. **KÖBERLE, F.** 1968. Chagas's Disease and Chagas' Syndromes: The Pathology of American Trypanosomiasis. En: Dawes, B. Advances in Parasitology, vol. 6, London, Gran Bretaña Ed. ELSEVIER, pp 63-110.
13. **MACEDO, A. M.; PIMENTA, J. R.; AGUIAR, R.S.; MELO, A.I.; CHIARI, E.; ZINGALES, B. et al.** 2001. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96(3):407-13.
14. **MINOPRIO, P.; ITOHARA S.; HEUSSER C.; TONEGAWA S.; COUTINHO, A.** 1989. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: The predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI cells. Immunol Rev 112: 183-207.
15. **MONTENEGRO, V.; JIMENEZ, M.; PINTO-DIAS, J.; ZELEDÓN, R.** 2002. Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. Mem Inst Oswaldo Cruz 97: 491-494
16. **ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS).** 2011. Lucha contra las enfermedades prevalentes y olvidadas [en línea] <<http://new.paho.org/blogs/esp/?p=272>> [consulta: 19 Junio 2011].
17. **PALÁU, M.T.; MEJÍA, A. J.; VERGARA, U.; ZÚÑIGA, C.** 2003. Action of *Trypanosoma rangeli* in infections with virulent *Trypanosoma cruzi* populations. Mem Inst Oswaldo Cruz 4:543-548.
18. **PANZERA, F.; DUJARDIN J.; NICOLINI, P.; CARACCIO, M.; ROSE, V.; TELLEZ, T.; BERMÚDEZ, H.; BARGUES, M.; MAS-COMA, S.; O'CONNOR, J.; PÉREZ, R.** 2004. Genomic Changes of Chagas Disease Vector, South America [en línea] <<http://www.cdc.gov/Ncidod/eid/vol10no3/02-0812.htm> > [consulta: 6 Septiembre 2010].
19. **PÉREZ, C.; VANEGAS, D.** 2007. Etiología, fisiopatología e inmunología de la enfermedad de Chagas En: Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, Enfermedad de Chagas, Bogotá, Colombia, pp 7-14.
20. **PIZZI, T.** 1957. *Inmunología de la enfermedad de Chagas*: Estado Actual del problema Monografía Biológica; U de Chile, Imp Stanley pp 450-464.
21. **PIZZI, T.; WALLACE, A.; VILLAGRA, R.; MUÑOZ, S.; ORTIZ, S.; SOLARI, A.** 2005. Concordancia de lesiones histológicas en ratones infectados por dos poblaciones de *Trypanosoma cruzi* de Chile. Rev Méd Chile 133: 432-438.
22. **RIVERA-VANDENPAS, M.; RODRÍGUEZ, A.; AFCHAIN, D.** 1983. *Trypanosoma cruzi* variation in susceptibility of inbred strains of rats. Acta Trop 40: 5-10.
23. **STURM, N.; DEGRAVE, E.; MOREL, C.; SIMPSON, L.** 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *T. cruzi* cells by amplification of kinetoplastid minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. Mol Biochem Parasitol 33: 205- 14.

- 24. THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH.** 2009. Tripanosomiasis Americana (Enfermedad de Chagas) [en línea]  
<[http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/tripanosomiasis\\_americana\\_chagas.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/tripanosomiasis_americana_chagas.pdf)>  
[consulta: 10 Septiembre 2010].
- 25. URZÚA, C.; MORALES, M. A; VERGARA, U.; PALAU, M. T.; ZÚÑIGA, C.** 2004. Sexo del hospedero y dosis infectante de parásitos como factores en el desarrollo de la infección con *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino. *Parasitol latinoam* 59: n.3-4: 104-109.
- 26. WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S.; WATSON, J.** 1982. Genetic control of response to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. *Infect Immun* 36: 637-644.
- 27. ZÚÑIGA, C., PALÁU, M.T., PENIN, P., GAMALLO, C., DE DIEGO, J.A.** 1997. Protective effect of *Trypanosoma rangeli* against infections with a highly virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. *Trop Med Int Health* 5: 482-487.
- 28. ZÚÑIGA, C., PARRA, A., VELA,H., COURCELLES, T., VARGAS,R., VERGARA, U.** 1998. Estudio histopatológico en ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol al Día* 22: 23-28
- 29. ZÚÑIGA, C.; VARGAS, R.; VERGARA, U.** 2002. Evolución de la infección con *Trypanosoma cruzi* en cepas susceptibles y resistentes de ratones. *Arch Med Vet* 2: 183-188.
- 30. ZÚÑIGA, C.; CEPEDA, R.; PALÁU, M. T.; VERA, A.; MEJÍA, J.; VERGARA, U.** 2007. Efecto protector de una cepa no virulenta contra la infección con una cepa virulenta de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino. *Arch Med Vet* 1: 77-82.