



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

INFLUENCIA DE LA DOSIS DE INOCULO INICIAL EN LA  
INFECCION CON *Trypanosoma cruzi* EN UN MODELO MURINO,  
SEGÚN EL SEXO

**CONSTANZA URZÚA MARFAN**

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

**PROFESOR GUÍA: DR. CLAUDIO ZÚÑIGA M., M.V, M.S.**

SANTIAGO, CHILE  
2004



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

INFLUENCIA DE LA DOSIS DE INÓCULO INICIAL EN LA  
INFECCIÓN CON *Trypanosoma cruzi* EN UN MODELO MURINO,  
SEGÚN EL SEXO

**CONSTANZA URZÚA MARFAN**

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

NOTA FINAL:.....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: DR. CLAUDIO ZÚÑIGA	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: DR. PEDRO CATTAN	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: DR. ULISES VERGARA	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**  
2004

## INDICE

- Resumen .....	1
- Summary .....	2
- Introducción .....	3
- Revisión Bibliográfica .....	4
- Objetivos .....	13
- Materiales y Métodos .....	14
- Resultados .....	17
- Discusión .....	29
- Conclusiones .....	35
- Referencias .....	36

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Claudio Zúñiga por darme todo su apoyo, conocimientos y amistad.

A la Dra. Angélica Morales, por su gran ayuda y buena voluntad.

A mi familia por apoyarme siempre en todos los proyectos que he emprendido.

A mis amigos, por nuestros interminables días de estudio y todo su cariño.

A mi novio, por todo su amor, ayuda y comprensión.

## **RESUMEN**

Se infectaron ratones de la cepa ACA, machos y hembras, con 200 y 2000 trypomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *Trypanosoma cruzi*. Todos los animales se comportaron como susceptibles a la infección, independientemente del sexo y la dosis de inóculo inicial. Los animales, tanto machos como hembras, infectados con 2000 parásitos presentaron niveles de parasitemia significativamente más altos que los ratones infectados con la dosis menor. A su vez, los machos desarrollaron niveles de parasitemia más altos que las hembras, tanto al infectar con 200 como con 2000 parásitos. A pesar de comportarse todos los animales experimentales como susceptibles, el período de supervivencia fue significativamente más prolongado en los machos infectados con 200 comparado con lo ocurrido con los machos infectados con 2000 parásitos. Las hembras infectadas con 2000 sobrevivieron más tiempo que los machos infectados con la misma dosis de parásitos. No se observaron diferencias significativas en el tiempo de supervivencia, al comparar hembras infectadas con 200 y 2000 ni tampoco en el caso de machos y hembras infectadas con 200 parásitos. Al parecer, la principal característica afectada por las variables sexo y dosis de inóculo inicial es el nivel de parasitemia.

## SUMMARY

Male and female mice of ACA strain were infected, with 200 and 2000 bloodstream trypomastigotes of Dm28c clone of *Trypanosoma cruzi*. All the animals were susceptible to the infection, regardless of their sex and dose of initial inoculum. The animals, both male and female, infected with 2000 parasites showed significantly higher levels of parasitemia than mice infected with the lower dose. At the same time, males developed higher parasitemia levels than females, when they were infected with both 200 and 2000 parasites. Despite of experimental animals behaved as susceptible, the survival period was significantly longer in males infected with 200, when compared with males infected with 2000 parasites. Females infected with 2000 survived a longer time than males infected with the same parasits dose. No significant differences were observed during the survival period, when comparing female infected with 200 and 2000, neither in the case of male and female infected with 200 parasites. Apparently, the main characteristic affected by the variables of sex and initial inoculum dose, is the parasitemia level.

## INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma cruzi*, protozoo hemoflagelado, es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas en el humano. Fue descrito en 1910 por el biólogo brasileño Carlos Chagas, al examinar los intestinos de insectos hematófagos. La tripanosomiasis americana representa un serio problema de salud pública en los países de América Latina, aunque la presencia de *T. cruzi* se describe desde la región de los grandes lagos en U.S.A. hasta la Patagonia, incluyendo zonas de Chile y Argentina. Según últimas estimaciones de la OMS, unos 60 millones de personas están expuestas al riesgo de contraer la infección y hay alrededor 11 millones de personas infectadas.

En el ciclo biológico de *T. cruzi* participan hospederos invertebrados como los insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae, como también hospederos vertebrados como el hombre, animales domésticos, principalmente perros, gatos y especies silvestres.

El modelo experimental más utilizado para estudiar esta parasitosis es probablemente el modelo murino, debido a su fácil manejo, mayor conocimiento de su estructura genética y porque las alteraciones que ocurren durante la etapa aguda de la infección son semejantes a las que ocurren en el humano.

El presente trabajo pretende analizar el desarrollo de la infección con dos dosis de inóculo inicial, 200 y 2000 trypomastigotes sanguíneos, del clon Dm28c de *T. cruzi* en ratones machos y hembras de la cepa ACA.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El parásito *Trypanosoma cruzi* causa la enfermedad de Chagas, en el humano, un síndrome debilitante e incurable que afecta a millones de personas en Latinoamérica (Dias *et al.*, 2002). En Chile, el territorio afectado abarca una extensión aproximada que equivale al 46.5 % de la superficie continental del país y se extiende entre los paralelos 18 a 34.5 latitud Sur, desde la frontera con Perú por el Norte, hasta la VI Región, por el Sur. Existe, por lo tanto, una población de alrededor de 7 millones de habitantes expuestos al riesgo de infección (Apt y Reyes, 1986; Dias *et al.*, 2002).

### Vectores

La principal vía de transmisión del parásito a los mamíferos es mediante insectos hematófagos de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, que al igual que *T. cruzi* sólo existen en Latinoamérica (Stevens *et al.*, 2001) y que son denominados vulgarmente, en Chile y Argentina, como “vinchucas”. Los principales vectores involucrados en la infección por *T. cruzi* son *Triatoma infestans* (Chile, Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Perú y Uruguay), *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius pallescens* (Colombia, Venezuela y Centro América), *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis* (Brasil). En Chile se han reconocido dos especies de vectores de importancia epidemiológica en la transmisión de la enfermedad, uno de características domésticas y el otro de características silvestres, ellos son *Triatoma infestans* y *Mepraia spinolai* (*Triatoma spinolai*) respectivamente (Schenone y Rojas, 1989; Lent *et al.* 1994; Canals *et al.*, 1999). También se describe una nueva especie silvestre, *Mepraia gajardoii* (Frías *et al.*, 1998), pero aún no se conoce su importancia epidemiológica. Al ser *T. infestans* el vector que participa en el ciclo doméstico de la enfermedad de Chagas es

posible encontrarlo en hábitats domésticos o peridomésticos, en cambio el hábitat de *M. spinolai* lo constituyen cerros, grietas en rocas, nidos de aves y también de mamíferos (Canals *et al.*, 1997; Canals *et al.*, 1999). A pesar de estos hábitats silvestres de *M. spinolai* y de ser una especie considerada de bajo riesgo para la salud humana se ha reportado que el 26% de estos insectos están infectados con *T. cruzi* en zonas suburbanas y que el impacto de *M. spinolai* en la enfermedad de Chagas es entre un 0,65 y un 5,8% (Acuña, 2002). Lo anterior adquiere aún mayor importancia al considerar factores que están influyendo cada día más en la posibilidad que *M. spinolai* pueda llegar a invadir ambientes domésticos, en primer lugar es importante tener en cuenta la colonización por parte del hombre de los hábitats de la vinchuca silvestre, seguido de la posibilidad que estos insectos se adapten progresivamente al hombre o a otros mamíferos domésticos. Otro punto importante de considerar son los esfuerzos que se han hecho por erradicar a la vinchuca doméstica, proceso que dejaría libre ese hábitat para ser ocupado por *M. spinolai* (Acuña, 2002). Con respecto a la erradicación de la vinchuca doméstica en 1991 se firmó un acuerdo entre los gobiernos de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Uruguay y Perú para controlar la enfermedad de Chagas mediante la eliminación del vector principal, *T. infestans* (Dias *et al.*, 2002). Este acuerdo, al parecer, ha dado buenos resultados debido a lo raro que es encontrar actualmente a *T. infestans* en los lugares donde estaba distribuido y una disminución de los índices de infección en niños recién nacidos desde que se implementó el programa (Schmunis 1999; Schofield y Dias, 1999). Todo esto se ha reflejado en la obtención de beneficios económicos debido a la reducción de la morbilidad y al ahorro de costos médicos. Debido a lo anterior, en el año 1999, Chile fue considerado como país libre de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas. Pero siempre existe el riesgo de la reaparición del problema por la supresión prematura de los programas de control.

## Agente etiológico

*Trypanosoma cruzi* pertenece al Phylum Protozoa, superclase Mastigophora de protozoos flagelados que no poseen cromatóforos. El orden es Kinetoplastida, cuyos miembros tienen un kinetoplasto (organelo autorregulable que contiene DNA) y de uno a cuatro flagelos. Familia Trypanosomatidae, al que pertenecen varios géneros de flagelados monógenos (parásitos de invertebrados) y heterógenos (parásitos con alternancia de evolución en hospederos invertebrados y vertebrados). Los tripanosomas son flagelados heterógenos que presentan durante su ciclo evolutivo diferentes formas celulares, tanto en el vector como en el hospedero. Pertenecen al grupo Stercorario con evolución a lo largo del tubo digestivo del vector y cuya transmisión se realiza a través de las heces. Género Trypanosoma y subgénero es Schizotrypanum, que incluye a los tripanosomas de kinetoplasto voluminoso, reproduciéndose de forma intracelular y la especie es *T. cruzi* (Stevens *et al.*, 2001).

## Ciclo biológico

*T. cruzi* es un protozoo heterógeno, con un complejo ciclo biológico con alternancia entre sangre y tejidos de un hospedero vertebrado y el tracto digestivo de un insecto vector, con cambios en su morfología y expresión antigénica.

*T. cruzi* puede presentar tres estados fisiológica y morfológicamente diferentes, caracterizados por la presencia o no de un flagelo evidente y la posición relativa del kinetoplasto (Vickerman, 1985; Braun y De Titto, 1985; Botero y Restrepo, 1992):

- **Epimastigote**, de aspecto fusiforme, de unos 20  $\mu\text{m}$  de longitud con kinetoplasto y flagelo anteriores al núcleo. Corresponde a la forma de

multiplicación del parásito en el intestino medio del vector y en los medios de cultivo axénicos. Su capacidad infectante es controversial.

- **Trypomastigote**, alargado y fusiforme, de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de longitud, con el núcleo en posición medial entre el kinetoplasto y el flagelo. Corresponde a la forma infectante para los hospederos mamíferos. Esta forma no se multiplica y se encuentra circulando en la sangre de los vertebrados (trypomastigote sanguíneo) y en el intestino posterior del vector (trypomastigote metacíclico).
- **Amastigote**, redondeado y ovalado de aproximadamente 1,5 - 4  $\mu\text{m}$  de diámetro, parece no poseer flagelo y éste sólo es evidente a la microscopía electrónica. Es la forma que parasita las células de los hospederos mamíferos y también presenta la capacidad de multiplicarse.

### Ciclo de Transmisión

El vector se infecta al ingerir sangre de un mamífero, o en algunos casos aves, con **trypomastigotes sanguíneos**. Estas formas sufren transformaciones a lo largo del tubo digestivo del vector. En este lugar se pueden evidenciar tres fases: formas redondeadas en el estómago, denominadas como esferomastigotes; en el tracto intestinal, los parásitos se multiplican por fisión binaria como **epimastigotes** ; al cabo de 15-30 días se transforman en **trypomastigotes metacíclicos**, que se acumulan en la ampolla rectal y son eliminados con las heces. Por lo general, el vector se torna infectante a los 20-30 días después de una alimentación con sangre infectada y puede permanecer así durante toda su vida, un año aproximadamente (Atías y Apt, 1991; Botero y Restrepo, 1992). Los triatomíinos infectados, al picar nuevamente a un mamífero y después de la

ingestión de sangre, habitualmente deyectan sobre la piel del hospedero. Cuando estas deyecciones contaminan el sitio de la picadura u otro punto lesionado, los parásitos ingresan al tejido. Los trypomastigotes que ingresan pueden infectar cualquier célula del organismo, pero teniendo predilección por ciertos órganos o tejidos dependiendo de la cepa de parásito. En el interior de las células, los parásitos se diferencian a la forma de **amastigotes**, que se multiplican por fisión binaria cada 12 horas. Después de varios ciclos reproductivos estas formas se diferencian en trypomastigotes, provocando la destrucción de la célula hospedera y escapando al líquido intersticial o a la sangre. Estos trypomastigotes sanguíneos pueden ir a infectar nuevas células reiniciando otros ciclos reproductivos.

A pesar de ser ésta la ruta clásica de transmisión, existen dudas que el parásito pueda atravesar la piel intacta, por lo que se acepta actualmente que la vía de entrada más frecuente son las mucosas, a nivel ocular, nasal o bucal. De hecho se postula que la infección de animales domésticos, como perros y gatos, ocurriría principalmente por vía oral, con deposiciones contaminadas presentes en el pelaje o alimentos (Schofield, 2000; Montenegro *et al.*, 2002) y no directamente por el vector, a diferencia de lo que ocurre en el humano. De la misma manera, los pequeños roedores, importantes reservorios en países como Brasil, Colombia y Venezuela, se infectarían principalmente por consumir insectos vectores infectados (Diotaiut *et al.*, 1995).

Los perros han sido considerados un importante reservorio doméstico de *T. cruzi*, en casi todas las ciudades de América Latina y en algunas áreas de Estados Unidos (Gütler *et al.* 1993; Meurs *et al.* 1998; Bradley *et al.* 2000). Incluso los perros también son víctimas comunes de la enfermedad, desarrollando alteraciones crónicas patológicas similares a las que se presentan en el humano (Williams *et al.* 1977; Andrade *et al.* 1997, Meurs *et al.* 1998). Las dos principales

fases de la enfermedad (aguda y crónica) pueden ser reproducidas en los perros (Andrade *et al.*, 1997), de hecho han sido recomendados como un buen modelo para el estudio de los cambios patológicos durante el curso de la enfermedad (Lana *et al.* 1992, Machado *et al.* 2001) y también como centinelas naturales en áreas donde se han efectuado campañas de control de vectores (Castañera *et al.* 1998). Sin embargo aunque se sabe que los perros pueden desarrollar la fase aguda y también la forma cardíaca (Lana *et al.*, 1992) e indeterminada (Machado *et al.*, 2001) de la fase crónica de la enfermedad, presentando sintomatología clínica, morfológica y electrocardiográfica similar a la observada en el humano, poco se sabe sobre la forma digestiva de presentación en este animal (Machado *et al.*, 2001).

Normalmente se ha asumido que los perros se infectan de la misma manera que los humanos, es decir, a través de heridas en la piel o a través de las mucosas por donde penetran los parásitos que se encuentran en heces u orina contaminadas dejadas en la zona por el insecto vector. A pesar de existir frecuentes reportes de perros y otros animales en que se les ha visto mascar o simplemente agarrar a los insectos vectores con su hocico, como un acto instintivo, se le ha dado poca atención a este mecanismo de transmisión de la infección. Esta ruta se ha probado experimentalmente y ha resultado ser muy efectiva para animales domésticos, salvajes y de laboratorio, indicando que bajo condiciones naturales esta forma de infección resulta muy eficiente, por lo tanto debiera ser considerada muy importante desde el punto de vista epidemiológico (Zeledón *et al.* 1977). Se ha encontrado que los perros tienen mayores tasas de prevalencia en comparación con los humanos en algunos países (Wisnivesky-Colli *et al.* 1985), lo que puede ser explicado por este mecanismo de transmisión oral. También es probable que esta sea la forma en que perros en algunas áreas

de Estados Unidos adquieren la infección, áreas donde la infección en el hombre es muy rara o prácticamente no existe (Williams *et al.* 1977).

Además, al igual que con cualquier patógeno que invade sangre, es posible que los individuos se infecten a través de transfusiones sanguíneas o trasplante de órganos. El parásito también puede transmitirse de madre a feto y la infección durante el embarazo puede resultar en abortos o nacimientos prematuros (Atías & Apt, 1991).

### **Formas clínicas**

La enfermedad consta de tres etapas claramente distinguibles, preferentemente en humano: la fase aguda de la enfermedad, generalmente asintomática y benigna. Las manifestaciones agudas aparecen lentamente después de un período de incubación de 3-12 días, presentando un cuadro clínico muy variable. La fase aguda comprende la primoinfección donde puede observarse el chagoma de inoculación, lugar de entrada del parásito, constituyendo un elemento de valor diagnóstico. Esta fase va acompañada por un aumento de parásitos en circulación, en los tejidos se encuentran células parasitadas e infiltrados en masa de células mononucleadas. En esta fase se pueden presentar alteraciones graves que lleven a la muerte del paciente, sin embargo el índice de mortalidad en esta fase es bajo, cercano al 10%. Luego de la fase aguda la sintomatología decae y se entra en la fase indeterminada o de latencia que se caracteriza por una lenta multiplicación intracelular de los parásitos y oligoparasitemias, sin signos clínicos (Atías & Apt, 1991; Botero y Restrepo, 1992). En contraste, en la fase crónica, que puede durar décadas en el humano y años en el ratón, hay escasa multiplicación de los parásitos y se caracteriza por la presencia de megasíndromes, especialmente a nivel de tejido cardíaco y digestivo (Atías & Apt, 1991).

## Modelos experimentales

*Trypanosoma cruzi* pareciera poder infectar cualquier célula eucariótica, sin embargo, en modelos *in vivo* no todos los tejidos resultan igualmente infectados (Zingales y Colli, 1985; Alcina y Fresno, 1987). La infección experimental por *T. cruzi* se ha reproducido, fundamentalmente la etapa aguda, en diferentes especies animales, como ser conejos (Texeira *et al.*, 1983), perros (Lana *et al.*, 1992), cobayos (Basombrío *et al.*, 1987), ratas (Revelli *et al.*, 1985), ratones (Bijovsky *et al.*, 1983; Zúñiga *et al.*, 2002) y primates no humanos (Rosner *et al.*, 1998).

En el modelo murino, distintas cepas de ratones difieren en la susceptibilidad o resistencia a la infección y se ha planteado que existiría un complejo control génico de los niveles de parasitemia y de la sobrevivencia de los animales infectados (Trischmann & Bloom, 1982; Zúñiga, 1995).

Por otro lado, aparte de las implicaciones evidentes en el humano, existe el problema de las alteraciones que la infección con trypanosomátidos pueda causar en los programas de vacunación animal. Puede ser, que los efectos directos del parásito sobre el animal no sean graves, pero como uno de los efectos de la infección es la inmunodepresión se debe tener en cuenta este factor, en las zonas endémicas, cuando se establezcan programas de vacunación masiva y no tener un falso sentido de protección en los animales infectados con *T. cruzi*, que puede acarrear graves consecuencias. Se está estudiando el caso de animales infectados con *T. brucei* en África, donde existen vastas zonas endémicas y la parte experimental en ratones apoyaría la idea del efecto negativo de este parásito en la efectividad de algunos esquemas de vacunación en animales infectados por trypanosomátidos (Onah & Walekin, 2000).

Existen múltiples factores, tanto dependientes del hospedero como del parásito, que se encuentran involucrados en determinar la resistencia o susceptibilidad a la infección. En relación al hospedador, factores genéticos como los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) parecen importantes para determinar el desarrollo de la infección (Juri *et al.*, 1990; Zúñiga, 1995; Zúñiga *et al.* 1997).

En este trabajo se pretende analizar dos de estos factores involucrados, como es el sexo de los individuos infectados y la dosis de inóculo inicial. Sobre el tema del sexo hay poca información en la infección con *T. cruzi* (Hauschka, 1947) y se plantea que aunque podrían haber diferencias no estarían relacionadas con efecto de las hormonas sexuales, en el ratón (Goble, 1952). En otros trabajos, se encontraron diferencias en la prepatencia y niveles de parasitemia, según el sexo en las cepas murinas A.Sn y AKR pero no a nivel de mortalidad (Zuñiga *et al.* 1997).

Este estudio también pretende aportar datos sobre la infección con el clon Dm28c de *T. cruzi*, el cual originalmente fue caracterizado como no virulento en ratones Balb/c (Contreras *et al.* 1988) y en otro trabajo como medianamente virulento pues mataba al 50% de los animales estudiados (Sánchez, 1992).

## **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la influencia del sexo y la dosis de inóculo inicial en el desarrollo de la infección con *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudiar el desarrollo de la infección en ratones machos y hembras de la cepa ACA, infectados con el clon Dm28c de *T.cruzi*, considerando prepatencia, niveles de parasitemia y mortalidad.
- Analizar la influencia de la dosis de inóculo inicial en el desarrollo de la infección con 200 y 2000 trypomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T.cruzi* en ratones de la cepa ACA, considerando prepatencia, niveles de parasitemia y mortalidad.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Parásitos**

Las infecciones experimentales se llevaron a cabo utilizando trypomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi* (Contreras *et al.*, 1988). Esta cepa de parásito fue donada por la Dra. A. Wallace de la Facultad de Medicina y es mantenida en el bioterio de la Unidad de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, por pasajes sucesivos en ratones Balb/c.

### **Ratones**

Se utilizaron ratones de la cepa ACA (H2<sup>f</sup>) (Klein *et al.*, 1983) . Esta cepa proviene originalmente del Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, U.S.A. y es mantenida por cruzamientos endogámicos en el Bioterio de la Unidad de Inmunología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

### **Modelos de Infección**

a) Se usaron dos grupos de ratones, 10 hembras y 10 machos, ambos de 10 semanas de edad. Los dos grupos fueron inoculados intraperitonealmente (i.p.) con 0.2 ml. de sangre que contenía aproximadamente 200 trypomastigotes sanguíneos de la cepa del parásito en estudio.

b) Otros dos grupos de ratones, 10 hembras y 10 machos, también de 10 semanas de edad fueron inoculados i.p. con 0.2 ml de sangre que contenía aproximadamente 2000 trypomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*.

c) Como grupo control se inocularon 10 ratones machos y 10 ratones hembras con 0.2 ml de sangre de ratones Balb/c sin infectar, se prepararon diluciones semejantes a las utilizadas con los animales infectados y también se procedió a efectuar la sangría de los ratones control paralelamente a las sangrías

de los animales experimentales. De esta manera se pretendió definir que los trastornos y muerte de los ratones problema se debía a la infección con *T. cruzi* y no a variables como la anemia producida como consecuencia de las sucesivas sangrías o a fenómenos adversos inducidos por la sangre Balb/c en forma independiente del parásito.

### **Dosis de parásitos inoculados**

La sangre fue extraída mediante punción cardíaca (0,6 ml.) de un ratón Balb/c infectado con el clon Dm28c, que se sacrificó en el momento. La sangre se colocó en un frasco estéril con 0,1 ml. de citrato de sodio, utilizado como anticoagulante. Luego se realizó una dilución de 10 ul de sangre infectada en 490 ul de suero fisiológico estéril para luego realizar un recuento de parásitos en cámara de Neubauer. Este procedimiento permitió determinar la cantidad de parásitos totales en los 0,6 ml de sangre. Se determinaron  $10^6$  parásitos en los 0.6 ml de sangre, implicando que al sacar 30 ul, esta muestra contiene aproximadamente  $5 \times 10^4$  parásitos. Posteriormente se realizaron las diluciones requeridas, de estos 30 ul para obtener, según el caso, aproximadamente 200 y 2000 parásitos en los 0,2 ml de inóculo para cada animal.

### **Estudio de Parasitemia**

Para la determinación de la prepatencia y niveles de parasitemia los animales infectados se sangraron a partir del tercer día postinfección (p.i), y luego se repitió día por medio hasta que la parasitemia fue negativa. La sangre de los ratones infectados fue obtenida por capilaridad de un corte en la vena caudal, en tubos de microhematocrito heparinizados, cada muestra fue posteriormente centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos y se dejó reposar por 30 minutos. Luego se calculó el volumen de sangre en cada tubo. La mayor concentración de parásitos se espera en la zona leucoplaquetaria, entre sangre y plasma, en este

lugar se cortó con un lápiz diamante y se colocó este volumen en un portaobjeto, que luego fue cubierto con un cubreobjeto de 20 x 20 mm. Finalmente se contaron los parásitos en 50 campos al azar, utilizando un aumento de 400 x. El cubreobjeto de 20 x 20 cubre 1600 campos, por lo tanto se derivó lo obtenido en 50 a 1600 campos y eso corresponde a los parásitos presentes en la muestra del tubo de microhematocrito, como esa cantidad de sangre fue medida previamente se llevó finalmente a número de parásitos por ml, todo esto de acuerdo al método descrito por Arias y Ferro (1988). Los resultados del número de parásitos obtenidos en cada día de estudio se expresaron como el promedio de parasitemia del grupo, más la desviación estándar correspondiente.

### **Análisis Estadístico**

Se realizó mediante un análisis de varianza para un experimento de dos factores en un diseño factorial, considerando los factores sexo y dosis de inóculo inicial.

$$Y_{ijk} : \mu + S_i + D_j + DS_{ij} + \xi_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  : valor que toma la variable en el individuo

$\mu$  : media poblacional

$S_i$  : efecto del sexo

$D_j$  : efecto de la dosis

$DS_{ij}$  : efecto de la interacción entre sexo y dosis

$\xi_{ijk}$  : error individual

El análisis de supervivencia se realizó de acuerdo al método de Kaplan-Meier (Kaplan y Meier, 1958).

## **RESULTADOS**

En los Gráficos 1 - 4 se muestra el desarrollo de la parasitemia en ratones de la cepa ACA, machos y hembras, infectados con 200 y 2000 trypomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*.

En el Gráfico 1 se puede ver la evolución de la parasitemia en ratones machos, infectados con 200 y 2000 parásitos. Se entiende por prepatencia al tiempo mínimo, luego de la infección, en que se evidencian parásitos en sangre y/o tejidos. El período de prepatencia, en ambos casos fue de 4 días post-infección (p.i.). Los niveles máximos de parasitemia fueron evidenciados, en ambas situaciones, al día 8 p.i. Al usar la dosis de inóculo de 200 parásitos, el valor máximo obtenido fue de  $6.1 \times 10^5$  parásitos por mililitro (ml) de sangre y al usar 2000 trypomastigotes, el valor máximo fue de  $2.2 \times 10^6$  parásitos/ml. El análisis estadístico, mostró que las diferencias entre estos valores, son significativas ( $p < 0.05$ ). En estos animales infectados con 200 y 2000 parásitos se evidenció parasitemia hasta los días 22 y 18 p.i., respectivamente.

En el Gráfico 2 se puede observar el desarrollo de la parasitemia en ratones hembras, infectadas con 200 y 2000 parásitos. En ambos casos, la prepatencia fue de 4 días p.i. Para el grupo infectado con la dosis menor, el nivel de máxima parasitemia se alcanzó al día 8 p.i. y fue de  $4.5 \times 10^5$  parásitos/ml mientras que el grupo infectado con 2000 parásitos presentó su nivel máximo al día 10 p.i. con  $1.4 \times 10^6$  parásitos/ml. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). En ambos casos se detectaron parásitos sanguíneos hasta el día 22 p.i.

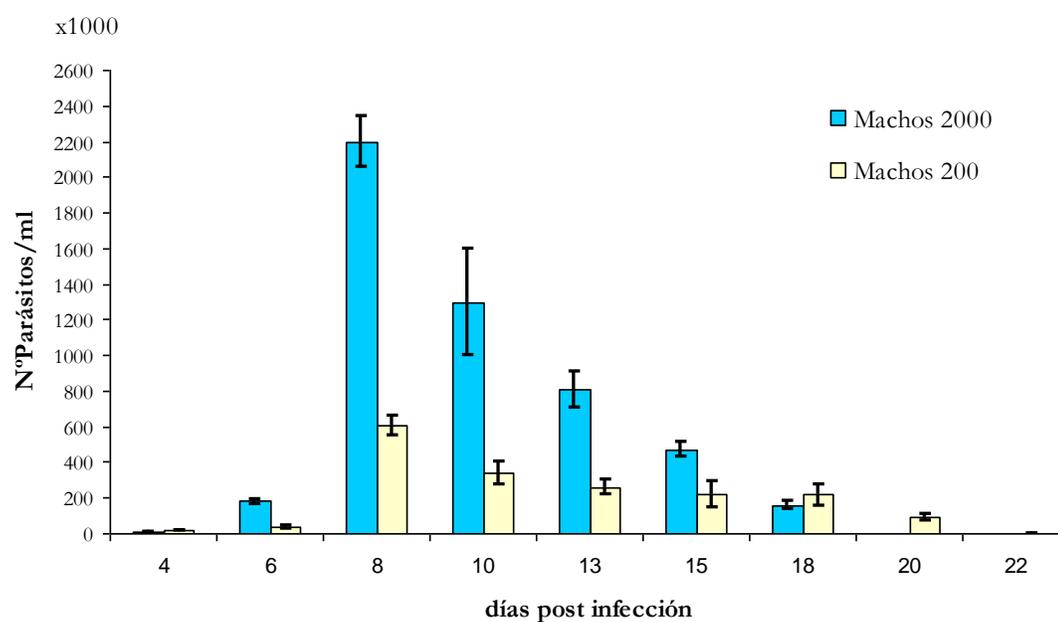
El Gráfico 3 muestra la comparación en el desarrollo de los niveles de parasitemia entre ratones, machos y hembras, infectados con 200 parásitos. No se observaron diferencias en la prepatencia (4 días p.i.), en la duración de la parasitemia (22 días p.i.) ni en el día de máxima parasitemia (8 p.i.), en estos dos grupos. La diferencia estuvo en los niveles máximos alcanzados puesto que los machos presentaron un valor de  $6.1 \times 10^5$  y las hembras  $4.5 \times 10^5$  parásitos/ml. Según el estudio estadístico, estos valores son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

La comparación de los niveles de parasitemia de ratones machos y hembras infectados con 2000 trypanomastigotes, se puede ver en el Gráfico 4. La prepatencia fue de 4 días p.i. para los dos grupos. En el caso de los machos, el nivel máximo de parasitemia se alcanzó al día 8 p.i. y fue de  $2.2 \times 10^6$  mientras que en las hembras el valor máximo fue de  $1.4 \times 10^6$  parásitos/ml obtenido al día 10 p.i. Las diferencias en los valores máximos de parasitemia fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

Los resultados del análisis de varianza para un experimento de dos factores, en este caso niveles de parasitemia en relación a sexo y dosis de inóculo inicial son estadísticamente significativas, en todos los casos estudiados.

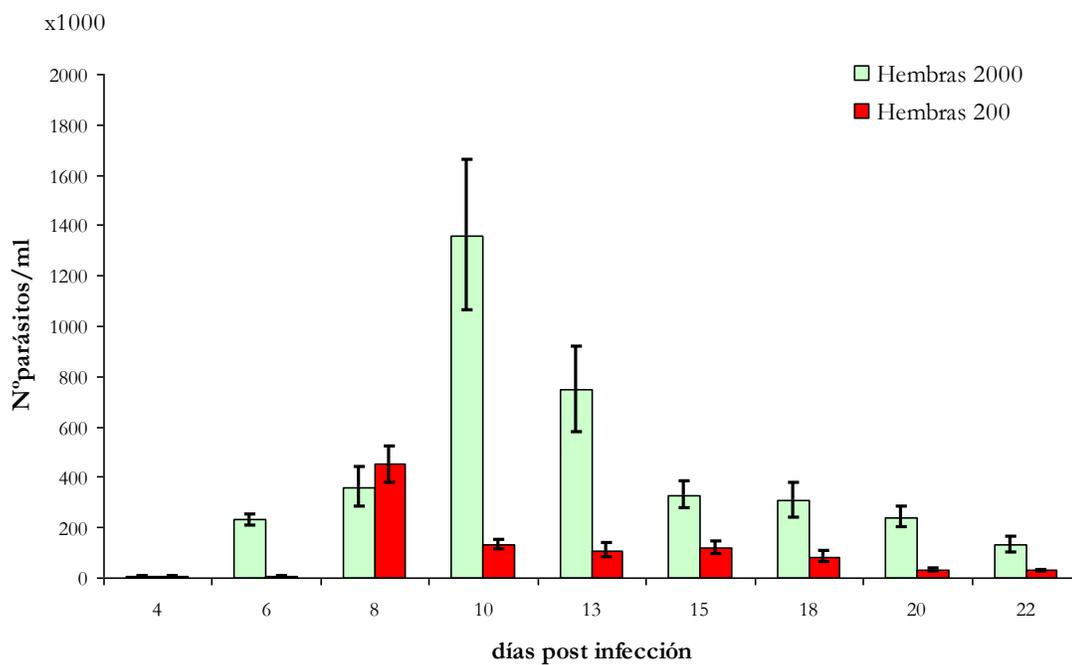
## GRÁFICO N° 1

**Niveles de parasitemia de ratones machos de la cepa ACA infectados con 200 trypomastigotes sanguíneos v/s la infección con 2000 trypomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi***



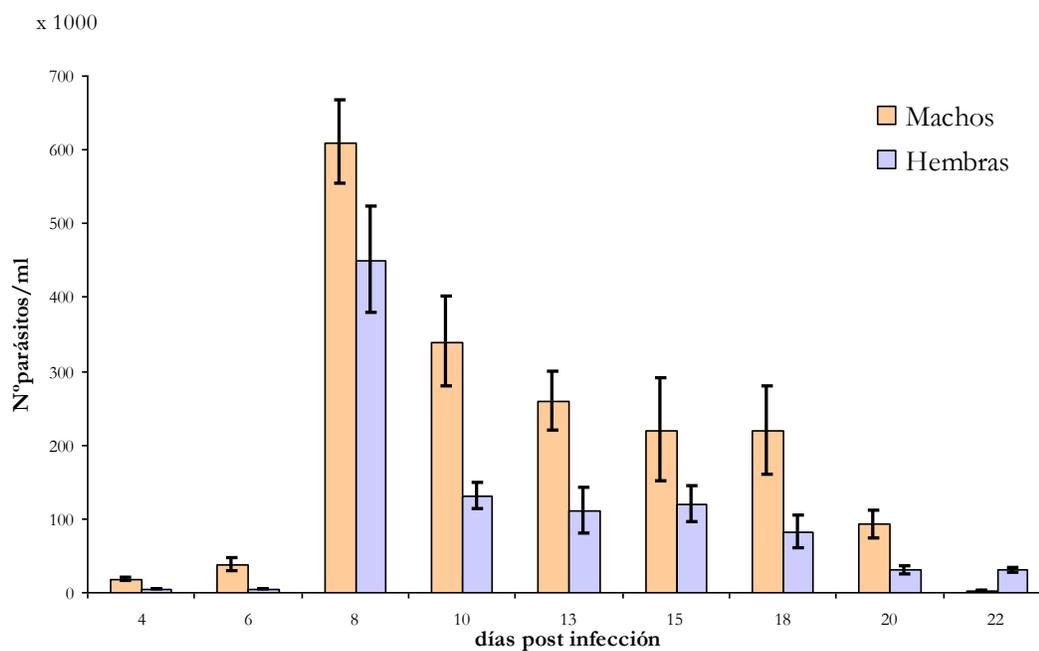
## GRÁFICO N° 2

Niveles de parasitemia de ratones hembras de la cepa ACA infectados con 200 trypomastigotes sanguíneos v/s la infección con 2000 trypomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*



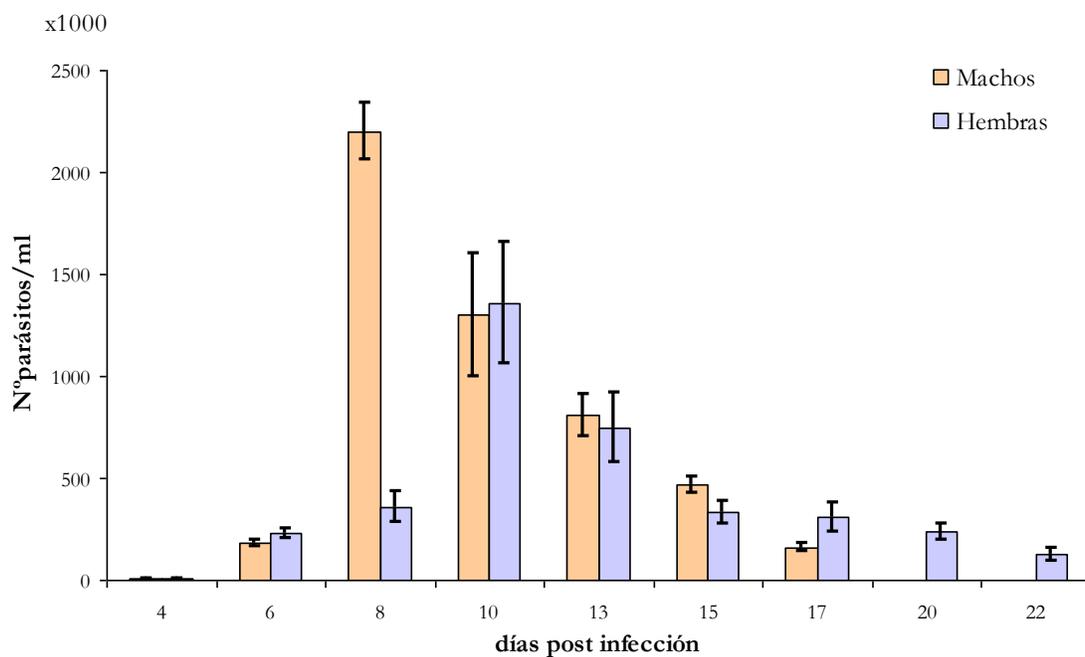
### GRÁFICO N° 3

Niveles de parasitemia de ratones machos v/s hembras infectados con 200 trypomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*



## GRÁFICO N° 4

Niveles de parasitemia de ratones machos v/s hembras de la cepa ACA infectados con 2000 trypomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*



La supervivencia de los diferentes grupos de animales infectados se muestran en los Gráficos 5 - 8. La comparación entre los resultados obtenidos en cada grupo se realizó según el método de Kaplan-Meier.

El Gráfico 5 muestra la supervivencia de ratones machos infectados con 200 y 2000 parásitos. En el primer caso el 50 % de los animales murió alrededor de los 20 días p.i. y la mortalidad fue de 100 % al día 28 p.i. Al infectar con 2000 parásitos, el 50 % de mortalidad se obtuvo a los 17 días p.i. y el 100 % al día 20 p.i. El análisis estadístico indicó que el valor de chi-cuadrado para estos dos grupos corresponde a 6.3, teniendo entonces una diferencia significativa al nivel de 5 %.

En el Gráfico 6 se puede observar la supervivencia de ratones hembras infectadas con 200 y 2000 trypomastigotes. Al día 22 p.i., en el primer grupo mencionado, se pudo observar un 40 % de mortalidad y un 50 % en el segundo grupo. En estos últimos animales se alcanzó el 100 % de muerte a los 24 días p.i. mientras que en los ratones infectados con la dosis menor se obtuvo un 70 % de mortalidad al día 32 p.i. y el 30% restante de los animales sobrevivieron hasta 6 meses p.i , momento en que fueron sacrificados. A pesar de lo anterior, al hacer la comparación de los dos grupos mediante el test log-rango se obtuvo un valor estadístico de chi-cuadrado de 2.4, lo que significa que este valor no representa una diferencia significativa entre ambos grupos.

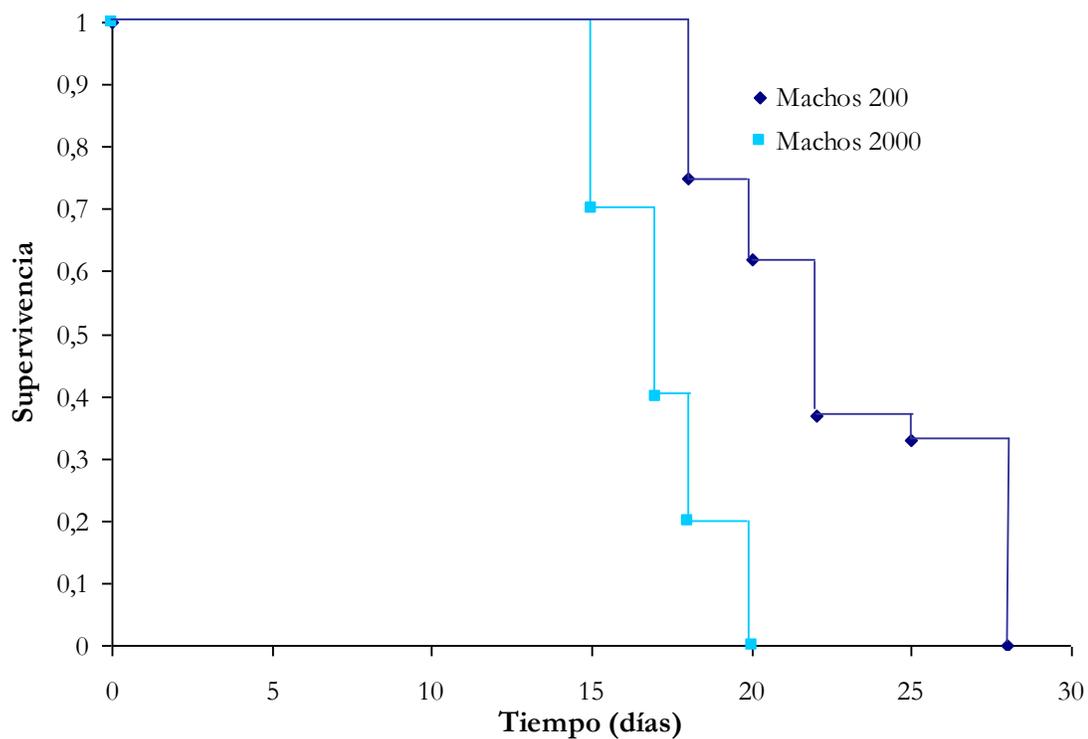
La comparación en la supervivencia de ratones machos y hembras infectados con 200 parásitos aparece representada en el Gráfico 7. En el primer grupo el 50 % de mortalidad ocurrió al día 20 p.i. y en el segundo al día 22 p.i. A

pesar que se observó un 30 % de sobrevivencia en el grupo de las hembras, el valor de chi-cuadrado obtenido en relación a estos dos grupos fue de 1.2, lo que no representa una diferencia significativa.

Por último, en el Gráfico 8 se puede observar la comparación de la sobrevivencia de ratones machos y hembras infectados con 2000 trypomastigotes. El 100 % de mortalidad en el primer grupo se obtuvo al día 20 p.i. y en el segundo al día 24 p.i. El valor estadístico de chi-cuadrado, en este caso, correspondió a 6.4 indicando una diferencia significativa a nivel de un 5 % entre ambos grupos.

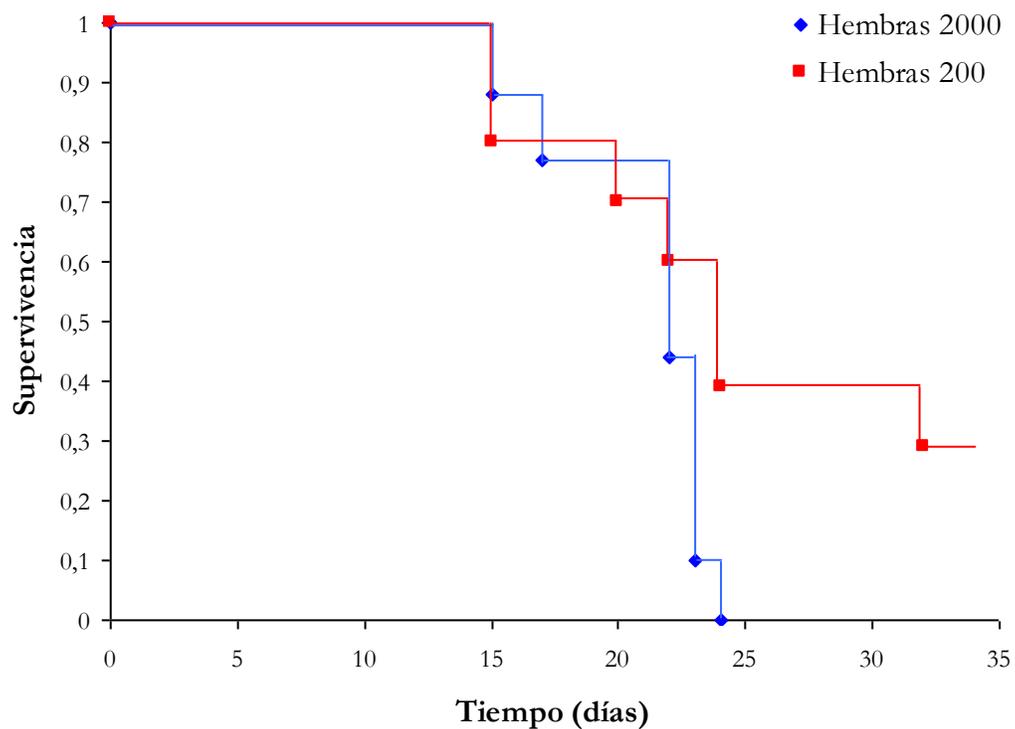
## GRÁFICO N° 5

**Supervivencia de ratones machos de la cepa ACA  
infectados con 200 y 2000 trypomastigotes sanguíneos  
del clon Dm28c de *T. cruzi***



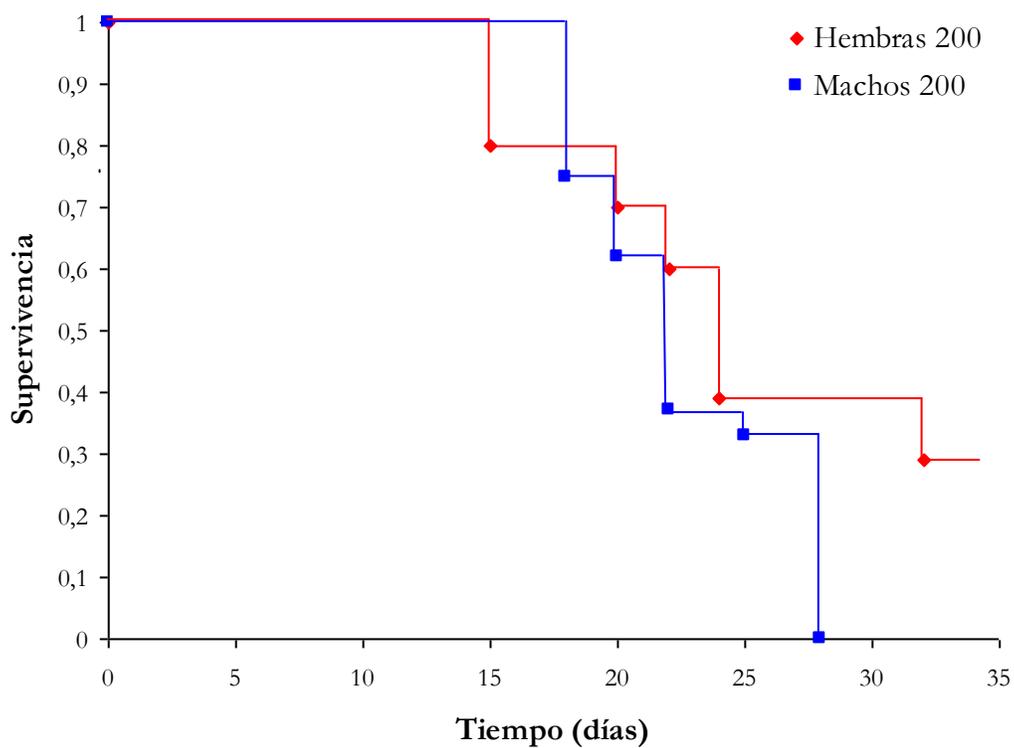
## GRÁFICO N° 6

Supervivencia de ratones hembras de la cepa ACA infectados con 200 y 2000 trypomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*



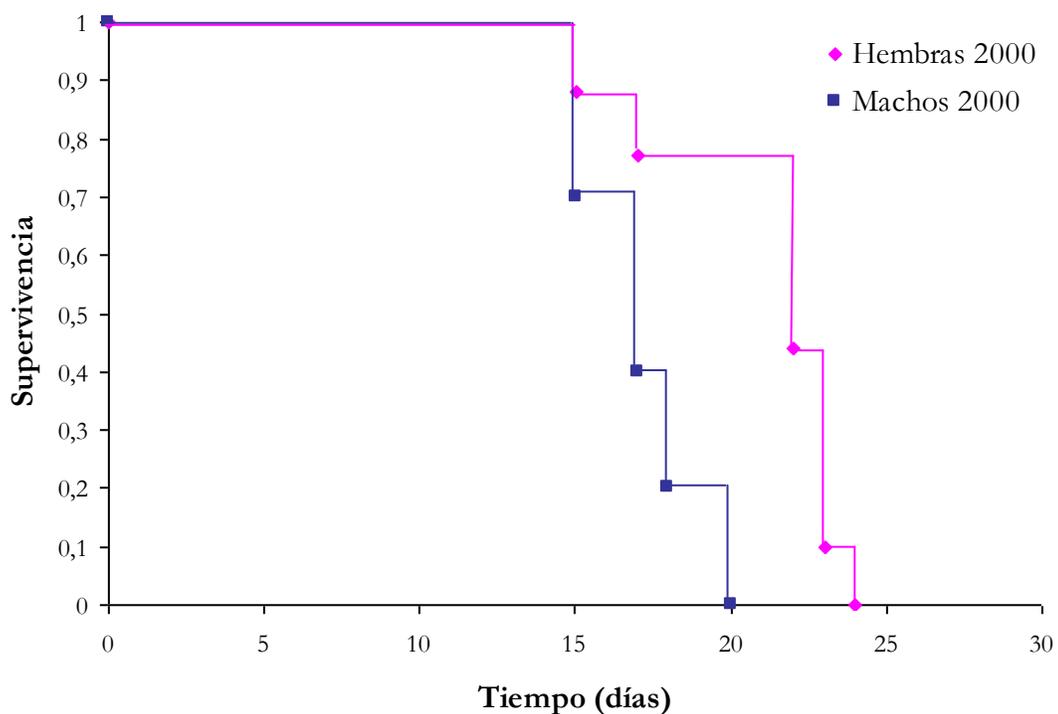
## GRÁFICO N° 7

Supervivencia de ratones machos y hembras de la cepa ACA infectados con 200 trypomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*



## GRÁFICO N° 8

Supervivencia de ratones machos y hembras de la cepa ACA infectados con 2000 trypomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*



## DISCUSIÓN

En condiciones naturales *T. cruzi* puede infectar alrededor de 100 especies de mamíferos de diferentes órdenes, incluyendo animales silvestres y domésticos (Botero y Restrepo, 1993; Teixeira *et al.*, 2001). De acuerdo a lo anterior, el cuadro agudo de la Enfermedad de Chagas puede ser reproducido, en forma experimental, en una variedad de especies.

La respuesta de diferentes cepas puras de ratones a la infección con una variedad de parásitos hemoflagelados ha sido estudiada en un esfuerzo por desarrollar modelos experimentales que ayuden a entender mejor las enfermedades que son producidas en el hombre y animales domésticos, por estos microorganismos.

Está descrito en la literatura que las distintas cepas puras de ratones de laboratorio difieren en la susceptibilidad o resistencia a la infección con *T. cruzi* y se ha planteado un complejo control génico en la sobrevivencia o muerte de los animales infectados (Wrightsmann *et al.*, 1982; Trischmann y Bloom, 1982; Zúñiga, 1995). Uno de los factores génicos importantes en este fenómeno de resistencia a la infección, parece ser el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), que corresponde a un conjunto de genes ligados en el cromosoma 17 del ratón y que está involucrado en la inducción de la respuesta inmune a una variedad de antígenos (Vergara *et al.*, 2002).

La combinación particular de genes MHC en un cromosoma se conoce como haplotipo. Se describen en las diferentes cepas puras de ratones, haplotipos

susceptibles y resistentes a la infección con *T. cruzi* (Wrightsmann *et al.*, 1982; Trischmann y Bloom, 1982; Juri *et al.*, 1990; Zúñiga, 1995; Zúñiga *et al.*, 2002).

En el desarrollo de la infección con *T. cruzi* influyen además varios otros factores dependientes tanto del hospedero (edad, sexo, cepa de ratón, etc.) como del parásito (cepa, número de parásitos inoculados, etc.).

En este trabajo de Memoria de Título se analizó la influencia de dos de estos factores, como son el sexo del hospedero y la dosis de inóculo inicial en ratones de la cepa ACA infectados con el clon Dm28c de *T. cruzi*.

La cepa de ratones ACA, que posee el haplotipo H2<sup>f</sup> (Klein *et al.*, 1983), es considerada como susceptible a la mayoría de las cepas de *T. cruzi* (Juri *et al.*, 1990 ; Vargas , 1998) lo cual está de acuerdo con lo obtenido en este estudio pues, independientemente del sexo o la dosis de inóculo, al infectar con el clon Dm28c de *T. cruzi* los animales se comportaron como altamente susceptibles.

Estos resultados difieren de trabajos anteriores (Contreras *et al.*, 1988; Sánchez, 1992) en cuanto a la virulencia del clon Dm28c, donde esta cepa de parásito es clasificada como medianamente virulenta. Pero los trabajos anteriores fueron realizados en ratones Balb/c y con trypomastigotes metacíclicos (originados de parásitos en cultivo axénico) y no parásitos sanguíneos, como en el presente trabajo. Lo anterior está de acuerdo con la idea que los conceptos de susceptibilidad y resistencia, al menos en el modelo murino, no son fenómenos generales y habitualmente están referidos a una cepa de ratón y/o una cepa de parásito en particular.

Al hacer una comparación intra grupo, por sexo, del efecto de la cantidad de inóculo inicial se puede ver que no se modifica la prepatencia pero sí los niveles máximos de parasitemia alcanzados. Los machos infectados con 2000 parásitos alcanzaron niveles significativamente mayores, que los machos infectados con 200 trypomastigotes, observando en las hembras una situación similar.

Al realizar la comparación inter grupo, según sexo, se pudo observar que tanto al infectar con 200 como con 2000 párasitos, los machos mostraron niveles más altos de parasitemia que las hembras. Los resultados obtenidos indican que el número de parásitos que ingresan originalmente al organismo modifican el desarrollo de la infección con *T. cruzi*, por lo menos considerando los niveles de parasitemia alcanzados. En humano este aspecto es muy poco conocido, debido a que habitualmente los pacientes estudiados ya están en la etapa crónica, con ausencia de parasitemia evidente.

Estudios previos sugieren que , al menos en modelos experimentales, los machos son más susceptibles que las hembras a la infección con *T. cruzi* (Hauschka, 1947 ; Prado *et al.*, 1997; De Souza *et al.*, 2001 ) pero los resultados obtenidos en este estudio parecen apoyar la idea que aún cuando los niveles de parasitemia son más altos en los machos que en las hembras (Zúñiga *et al.*, 1997 ), no se llega al extremo que las hembras sean resistentes y los machos susceptibles, como ocurre en las ratas de la cepa F344 , donde la infección con *T. cruzi* produce la muerte sólo de los machos (Rivera-Vandenpas *et al.*, 1983 ). También estos resultados están de acuerdo con el concepto que los niveles de parasitemia son sólo un parámetro más a considerar en la infección con *T. cruzi* pero parece no existir una correlación directa con la susceptibilidad o resistencia en términos

de sobrevivencia o muerte de los animales infectados (Minoprio *et al.*, 1989). Está descrito que cepas resistentes de ratones pueden alcanzar niveles de parasitemia mayores que cepas susceptibles infectados con la misma cepa de parásito (Zuñiga, 1995; Zúñiga *et al.*, 2002).

Como todos los animales se infectaron, se utilizó la muerte o sobrevivencia como criterio de susceptibilidad o resistencia a la infección, respectivamente. De acuerdo a esto, todos los animales infectados se comportaron como susceptibles. Sin embargo, al analizar la sobrevivencia de ratones machos infectados con las diferentes dosis de inóculo se puede ver que, el 100 % de mortalidad acumulada ocurre en un período significativamente más corto de tiempo en los animales infectados con 2000 parásitos y que los ratones infectados con 200 parásitos tienen un tiempo de sobrevivencia más largo.

Al analizar los grupos de hembras infectadas con 200 y 2000 parásitos no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al período de sobrevivencia, a pesar que al infectar con 200 sobrevivió el 30 % de los animales. Lo anterior parece estar influenciado por el bajo número de animales utilizados, probablemente con un mayor número de ratones experimentales, en este caso, las diferencias sean significativas.

Al comparar la sobrevivencia de machos y hembras infectados con 200 trypomastigotes, tampoco se observaron diferencias significativas. Estas diferencias si se hicieron evidentes, entre machos y hembras, al infectar con 2000 parásitos, pues las hembras sobrevivieron más tiempo que los machos, siendo este período estadísticamente significativo.

A pesar que diversos trabajos han tratado de relacionar la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* con el efecto de las hormonas sexuales, los resultados no han aclarado totalmente la situación. Ratones hembras de la cepa CFI, ovariectomizadas, presentan una mayor mortalidad (90 %) y mayores niveles de parasitemia en relación a las hembras controles, que presentan un 30 % de mortalidad, al ser infectadas con la cepa Brasil de *T. cruzi*. En este mismo estudio, los machos castrados no presentaron diferencias significativas al ser comparados con machos controles, todos infectados con la misma cepa de *T. cruzi* (Chapman *et al.*, 1975).

*Calomys callosus* es un roedor silvestre que habitualmente está infectado con *T. cruzi*, en forma natural. Hembras de esta especie, ovariectomizadas, al igual que el caso anterior, presentan mayores niveles de parasitemia, en relación a los controles, al ser infectadas con la cepa Y de *T. cruzi*. Dosis previas de progesterona, estrógenos o una combinación de ambos, en las hembras operadas, baja los niveles de parasitemia con valores semejantes a los controles (Prado *et al.*, 1997). Machos de *C. callosus*, orquiectomizados, presentan niveles de parasitemia más bajos que los machos no castrados, al ser infectados con la cepa Y de *T. cruzi*. Tratamiento de los machos castrados con testosterona eleva los niveles de parasitemia semejante a lo descrito en los machos control.

Se postula entonces, que las hormonas sexuales cumplirían un papel importante en la defensa contra la infección por *T. cruzi* y que la testosterona, por su rol inmunoinhibidor, sería un agente causal importante en la diferencia entre machos y hembras, en cuanto a la respuesta a la infección con *T. cruzi*. Sin embargo, en un modelo murino, al relacionar la posición social de los machos y la producción de hormonas sexuales se encontraron resultados que se

contraponen a los mencionados anteriormente. Se encontró que al infectar grupos de ratones Balb/c, los machos dominantes presentaban mayores niveles de testosterona y menores niveles de parasitemia comparados con machos inferiores en posición social, los cuales presentaban menores niveles de testosterona y mayores niveles de parasitemia ( Schuster y Schaub, 2001 ).

Todo parece indicar, entonces, que el problema no está referido a algo tan simple como diferencias en una hormona u otra sino que debe existir una compleja regulación neuro-inmunológica en el control de los niveles de parasitemia y la susceptibilidad o resistencia a la infección con *T. cruzi*.

## CONCLUSIONES

El clon Dm28c de *T. cruzi* se comporta como altamente virulento al infectar ratones de la cepa ACA.

Los animales infectados con 2000 parásitos, tanto machos como hembras, presentan niveles significativamente más altos de parasitemia que los infectados con 200 parásitos.

La cantidad de parásitos inoculados modifica el período de supervivencia de los machos pero no de las hembras.

El nivel de parasitemia es afectado por el sexo del hospedero y la dosis de inóculo inicial.

## REFERENCIAS

- **Acuña, A.** 2002. La vinchuca silvestre: ¿Una amenaza latente? Tecnovet. 2: 14 – 18.
- **Alcina A, Fresno M.** 1987. Interacción del *Trypanosoma cruzi* con el sistema inmunitario. Inmunología. 6: 45 – 55.
- **Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Wenthold RJ, Hilbert Jr SL, Ferrans VJ.** 1997. The indeterminate phase of Chagas disease: ultraestructural characterization of cardiac changes in the canine model. Am J Trop Med Hyg 57:328 - 336.
- **Apt W, Reyes H.** 1986. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas I. Distribución geográfica, índices de infección en vectores y humanos. Parasitol. al Día 10:94 - 101.
- **Atías A, Apt W.** 1991. Enfermedad de Chagas. En: Parasitología Clínica, 3ª ed. Ed. Mediterráneo. Santiago, Chile. pp 255 – 268.
- **Arias A, Ferro E.** 1988. Quantification of *Trypanosoma cruzi* parasitemia by direct micromethod . Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 82:248.
- **Basombrío MA, Arredes H, Uncos D, Rossi R, Alvarez E.** 1987. Field trial of vaccination against American Trypanosomiasis (Chagas disease) in domestic guinea pig. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37:57 – 62.

- **Bijosvky AT, Elizari M, Muller L, Katzin V, Gonzalez-Cappa, S.** 1983. Chronic infection in mice with *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 25:207 – 214.
  
- **Botero D, Restrepo M.** 1992. Parasitosis humanas. Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. Pp.191 - 206.
  
- **Bradley KK, Bergmandk J, Woods JP, Crutcher JM, Kirchoffl V.** 2000. Prevalence of American trypanosomiasis (Chagas disease) among dogs in Oklahoma. JAVMA 217:1853 - 1857
  
- **Braun M, De Titto E.** 1985. Respuesta inmune al *Trypanosoma cruzi*. Act. Physiol. Pharmacol. Latinoam. 35:1 – 47.
  
- **Canals M, Solis R, Valderas J, Ehrenfeld M, Cattán PE.** 1997. Preliminary studies on temperature selection and activity cycles of *Triatoma infestans* and *T. spinolai* (Heteroptera: Reduviidae), Chilean vectors of Chagas disease. J. Med. Entomol. 34 : 11 – 17
  
- **Canals M, Solis R, Tapia C, Ehrenfeld M, Cattán PE.** 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. 5:687 – 692.
  
- **Castañera MB, Lauricella MA, Chuit R, Gutler RE.** 1998. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of

north-western Argentina. in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Parasitol. Res 7:513 – 520.

- **Dias JCP, Silveira AC, Shofield CJ.** 2002. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America – A Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97: 603 - 612.
  
- **Diotaiuti L, Pereira A, Loiola C, Fernandez A., Schofield C, Dujardin J, Dias J, Chiari E.** 1995. Interrelation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 90: 443 – 448.
  
- **Frías D, Henry A, Gonzalez CR.** 1998. *Mepraia gajardoii*: a new species of Triatomidae (Hemiptera: Reduviidae) from Chile and its comparison with *Mepraia Spinolai*. Rev. Chile Hist. Nat. 71: 178 - 188.
  
- **Goble F.** 1952. Lack of effect of sex hormones on the course of experimental Chagas disease in mice. J. Parasitol. 78: 15 – 16.
  
- **Gütler RE, Cécere MC, Petersen MR, Rubel ND, Schuigmann NJ.** 1993. Chagas disease in north-west Argentina: association between *Trypanosoma cruzi* parasitemia in dogs and cats and infections rates in domestic *Triatoma infestans*. Trans Soc Trop Med Hyg 87: 12-15.
  
- **Hauschka T.** 1947. Sex of host as factor in Chagas disease. J. Parasitol. 33:399 – 405.

- **Juri M, Ferreira A, Ramos A, Hoecker G.** 1990. Non-lytic antibodies in H-2 controlled resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi*. Braz.J. Med. Biol. Res. 23: 685 – 695.
  
- **Kaplan E, Meier P.** 1958. Non parametric estimation from incomplete observation. JASA 53:457 - 481.
  
- **Klein J, Figueroa F., David C.** 1983. H-2 haplotypes. Genes and antigens: Second listing. Immunogenetics 17:553 - 596.
  
- **Lana M, Chiari E, Tafuri WL.** 1992. Experimental Chagas disease in dogs. Mem Int Oswaldo Cruz 87:59 - 71.
  
- **Lent H., Jurberg J, Galvao C.** 1994. Revalidacao do genero Mepraia, Mazza, Gajardo & Jorg, 1940 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 89:347 - 352.
  
- **Machado EM, Camilo Jr DJ, Pinheiro SW, Lopes ER, Fernandez AJ, Dias JCP, Addad SJ.** 2001. Morphometry of submucous and mesenteric esophageic plexus of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 96:545 - 548.
  
- **Meurs KM, Anthony MA, Slater M, Miller MW.** 1998. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection in dogs: 11 cases (1987-1996). JAVMA 213: 497-500.

- **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.
  
- **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.
  
- **Onah D, Wakelin D.** 2000. Murine model study of the practical implication of trypanosome-induced immunosuppression in vaccine-disease control programmes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 74:271 - 284.
  
- **Prado Jr JC, Leal MP, Anselmo-Franci J, De Andrade Jr H, Kloetzel J.** 1997. Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi* . *Parasitol Res* 2:100 – 105.
  
- **Revelli S, Moreno H, Berra H, Velenti J, Nocito A, Amario N, Morini J.** 1985. Efectos de extractos ricos en AR inmune sobre algunos parámetros inmunopatológicos de ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*. *Bol. Chil. Parasitol.* 40:51 – 57.
  
- **Rivera-Vandenpas M, Rodriguez A, Afchain D.**1983. *Trypanosoma cruzi*: variation in susceptibility of inbred strains of rats. *Acta Trop.* 40:5 - 10.

- **Rosner J, Schinini A, Rovira T, De Arias A, Velazquez G, Monzon M, Maldonado M, Ferro E, Galeano R.** 1998. Acute Chagas'disease in non human primates. *Trop. Med. Parasit.* 39:51 - 55.
- **Sanchez G.** 1992. Estudio de la variabilidad en poblaciones y clones de *Trypanosoma cruzi* por criterios biológicos, inmunológicos y bioquímicos. Tesis entregada como requisito para optar al Grado de Doctor en Ciencias, Mención Biología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. pp 3 – 8.
- **Schenone H, Rojas A.** 1989. Algunos datos y observaciones pragmáticas en relación a la epidemiología de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chil. Parasitol.* 44:66 – 86.
- **Schofield CJ, Dias JCP.** 1999. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv. Parasitol.* 42:1 - 27.
- **Schofield CJ.** 2000. *Trypanosoma cruzi* – The vector –parasite paradox. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 4:535 – 544.
- **Schuster JP, Schaub, GA.** 2001. Experimental Chagas disease: the influence of sex and psychoneuroimmunological factors. *Parasitol. Res* 12:994 – 1000.
- **Shmunis GA.** 1999. A tripanossomíase americana e seu impacto na Saúde Pública das Américas. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Eds. Z Brener, ZA Andrade, M Barral Netto. 2ª. Ed. Guanabara-koogan, Rio de Janeiro, p 1-15.

- **Stevens J, Noyes H, Schofield C, Gibson W.** 2001. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv. Parasitol.* 48: 1 – 53.
  
- **Texeira AR, Figueiredo F, Rezende F, Macedo V.** 1983. Chagas disease. A clinical parasitology, immunological and pathological study in rabbits. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32:258 – 272.
  
- **Texeira A, Sadi P, Rebelo E, Algorañaz D, Vieira L, Lauria-Pires L, Nascimento R, Vexenant A, Silva A, Ault S, Costa J.** 2001. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm threes in the Amazon. *Emerg. Infect. Dis* 1:100 – 112.
  
- **Trischmann T, Bloom B.** 1982. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 35:546 – 551.
  
- **Vargas R.** 1998. Péptidos sintéticos en el estudio de la respuesta inmune en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. Tesis entregada como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas, Mención Inmunología. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. pp 26 – 36.
  
- **Vergara U, Palomo I, Zúñiga C, Navarrete C.** 2002. Complejo Principal de Histocompatibilidad. En: *Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica.* Ed. Universidad de Talca. Chile. pp 167 – 178.
  
- **Vickerman K.** 1985. Developmental cycles and biology of pathogenic Trypanosomes. *Brit. Med. Bull.* 41:105 – 114.

- **Williams GD, Adams G, Yaeger RG, Mc Grath KK, Read WK, Bidelback WR.** 1977. Naturally occurring trypanosomiasis (Chagas disease) in dogs. *JAVMA* 15:171-177.
  
- **Wisnivesky-Colli C, Gurtler RE, Solarz ND, Lauricella MA, Segura MA.** 1985. Epidemiological role of humans, dogs and cats in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a central area of Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 27:346-352.
  
- **Wrightsmann 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.
  
- **Zeledón R, Trejos M, Chinchilla M.** 1977. Experimental infection of mice with blood, culture and insect forms of *Trypanosoma cruzi* by different routes. *Protozoology* 3:95-101.
  
- **Zingales B, Colli W.** 1985. *Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.* 117:129 – 152.
  
- **Zuñiga C.** 1995. Evolución de la respuesta inmune en ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*. Tesis entregada como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas, Mención Inmunología. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. pp 46 – 53.

- **Zúñiga C, Vargas R, Courcelles T, Vergara U.** 1997. Infección experimental con *Trypanosoma cruzi* en machos y hembras de tres cepas de ratones. Parasitol. al Día. 21:85 – 91.
  
- **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.