

Importancia de la especie del mamífero en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*.

Minerva Vergel, Servio Urdaneta-Morales.

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, se transmite en su ciclo doméstico, entre una docena de especies de insectos vectores (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) y unas diez especies de mamíferos reservorios domésticos o sinantrópicos. Sin embargo, los estudios realizados para determinar los atributos de los componentes del ciclo mediante los cuales contribuyen a causar enfermedad han sido focalizados, mayormente, con respecto al parásito; relativamente pocos han determinado la importancia del mamífero en la relación parásito-hospedador. Se evaluaron parasitológicamente algunas de las propiedades del mamífero envueltas en esta interacción, infectando en paralelo por vía i.p. lotes de ratones NMRI (10 g promedio) y ratas Wistar (50 g promedio) con 10^4 tripomastigotes sanguíneos/g de peso de tres cepas procedentes del vector, del reservorio y del humano. En el modelo murino, las prepatencias se correlacionaron directamente con las parasitemias máximas de 10^6 tripomastigotes/ml de sangre que produjeron 100% de mortalidad; en las ratas, se obtuvieron parasitemias tardías con máximos de 10^3 sin causar mortalidad. El mitotropismo cardíaco, esquelético y del músculo liso de los intestinos varió de abundante a profuso acompañado de miocarditis y miositis e infiltrados linfomacroeosinobasofílicos que variaron de escasos a numerosos, extensos y dispersos; el parasitismo en hígado, bazo y pulmón varió de ausente a escaso, según la cepa trabajada en los ratones; en contraste con las ratas, que mostraron cardio y mitotropismo esquelético escaso e infiltrados extensos y dispersos pero muy escasos; hubo ausencia de histotropismo e infiltrados en las vísceras restantes. Comparamos nuestros resultados con los de otros autores que usaron modelos experimentales similares, con el propósito de discutir las propiedades de virulencia y patogenicidad como propiedades atribuidas al parásito, así como las inherentes al hospedador para enfatizar con ello que, las atribuciones que aporten en conjunto el protozoario y el mamífero son, ambas, los elementos relevantes de ésta interrelación parasitaria.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, interacciones y atributos parásito-mamífero, ratón NMRI, rata Wistar.

ABSTRACT

Importance of the species of mammal in the experimental infection by *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi, the causal agent of Chagas' disease circulates in its domestic environment, throughout a dozen of

Laboratorio de Biología de *Trypanosoma* de Mamíferos, Instituto de Zoología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Apartado 47058, Los Chaguaramos, Caracas, Venezuela.

Correspondencia: Servio Urdaneta-Morales. E-mail: tropism2006@yahoo.es

Financiamiento: CDCH-UCV (PG 03-00-5609-2004; PG 03-31-4729-2006) FONACIT (G-2005000406).

insect vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) and about ten species of domestic or sinantropic mammal reservoirs. Nevertheless, studies to determine the attributes of the components of the cycle contributing to cause disease, have been focused mainly with respect to the parasite; few have determined the importance of the mammal in this parasite-host relation. Some of the properties of the mammal in this interaction were evaluated parasitologically, infecting i.p. batches of NMRI mice and Wistar rats with 1×10^4 blood trypomastigotes/g body weight of three stocks coming from the vector, reservoir and human. In the murine model, the prepatent periods were correlated with peak of parasitemias of 10^6 trypomastigotes/ml blood producing 100% of mortality; in the rats, there were delayed parasitemias of 10^3 trypomastigotes/ml blood without causing mortality. Cardiac, skeletal and smooth mitotropism varied from abundant to profuse accompanied with myocarditis and myocytis; lymphomacroeosinobasophilic infiltrates varied from scarce to numerous, extensive and dispersed; the parasitism in liver, spleen and lung varied from absent to scarce, according to the *T. cruzi* stock worked in the mice. In contrast, the rats showed scarce, extensive and dispersed cardio and skeletal mitotropism but very scarce infiltrates; there was absence of histotropism and infiltrates in the remaining viscera. We compared our results with those of other authors that used similar experimental models. Also, we discuss virulence and pathogenicity like properties of the parasite to emphasize that, in our opinion, the attributes that contribute altogether the microorganism and the host are the relevant elements of this parasitic interrelation.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, parasite-host attributes, interaction, NMRI mouse, Wistar rat.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), agente causal de la enfermedad de Chagas es un hemoflagelado intracelular con diferentes propiedades biológicas y genéticas que provocan una elevada variedad en su infectividad y virulencia, así como en el parasitismo tisular y en la patología que produce en, prácticamente, todos los tejidos y vísceras de sus hospedadores mamíferos. Este comportamiento es una característica dependiente de las interacciones parásito-hospedador las cuales, a su vez, se relacionan con la capacidad del microambiente tisular sobre el control de la infección por el protozoario (1, 2).

Este intrincado comportamiento se lo ha relacionado con la comprobada variabilidad genética de las poblaciones del tripanosoma (3), una consecuencia de su complejo ciclo de vida en el cual intervienen una docena de especies de insectos estrictamente hematófagos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) que actúan como vectores que se han domiciliado y unas diez especies de mamíferos reservorios con hábitos domésticos y sinantrópicos (1). Como ha sido mostrado (4), las variables que intervienen en la dinámica de transmisión de *T. cruzi* en el ambiente silvestre son tan

complejas que lleva a los autores a sostener que, en cada ecótopo del parásito, sus interrelaciones con los hospedadores son eventos únicos; probablemente esta situación ocurre también en el ámbito doméstico.

Las investigaciones realizadas para determinar las bases de estas interacciones, han utilizado varias especies de mamíferos experimentales (5) en las cuales han sido reproducidos diferentes aspectos de la enfermedad humana. Sin embargo, la bibliografía muestra que numerosas publicaciones carecen de información confiable y reproducible de los modelos usados al omitir parámetros tales como: características de las cepas de los parásitos (especie y origen geográfico del vector o del reservorio donador); cuantificación del inóculo/g de peso del animal experimental; estadio del flagelado usado y su vía de inoculación; tiempo de aislamiento de la cepa y esquema de su mantenimiento; cepa, sexo y edad (peso) del animal experimental. Asimismo, existe una tendencia a enfatizar (muchas veces sin resultados evidentes) la importancia de la influencia de las propiedades biológicas del tripanosoma en detrimento de las inherentes al mamífero que forma parte del modelo usado, es decir de las interacciones patógeno-hospedador que se desean precisar.

Por otra parte, es un hecho común que los resultados que se presentan sobre la determinación de variables fundamentales que se consideran propias del parásito—virulencia, patogenicidad, histotropismo, daño tisular son producto de investigaciones en modelos constituidos por una sola especie de animal y varias cepas de *T. cruzi*; omitiendo así estudios comparativos que demuestren el comportamiento de las cepas del tripanosoma en varias especies de mamíferos. En nuestra opinión, estas investigaciones carecen de la posibilidad de precisar tales resultados como producto del comportamiento de ambos asociados.

En base a estas consideraciones, nos propusimos determinar las diferencias que los modelos utilizados (ratón y rata) considerados como de alta y baja tolerancia al *T. cruzi*—respectivamente, provoquen en: la infectividad de cepas del parásito con orígenes diferentes (reservorio, vector y humano); la patogenicidad en la infección (expresada como la capacidad de producir alteraciones tisulares y mortalidad); la virulencia, manifestada por el grado de multiplicación que logre este parásito (6).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y cepas de *T. cruzi*. Infecciones experimentales.
Tres lotes de 6 ratones albinos exógamos (cepa NMRI) de 10 g promedio y tres lotes de 6 ratas albinas exógamas (cepa Wistar) con promedio de 50 g (n= 36), procedentes del bioterio del Laboratorio de Biología de *Trypanosoma* de mamíferos, Instituto de Zoología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, fueron inoculados por vía intraperitoneal con 1×10^4 tripomastigotes sanguíneos/g de peso del animal, obtenidos por cardiopuntura de animales donadores en fase aguda de la infección.

Las cepas utilizadas codificadas (7) fueron: MDID/VE/1989/Turumo obtenida mediante xenodiagnóstico de un rabipelado (*Didelphis marsupialis*) adulto, capturado en la población "Turumo" del estado Miranda; TPRX/VE/1987/Trujillo, aislada de un ejemplar adulto de *Rhodnius prolixus* capturado en la zona "Tres Matas", endémica para la enfermedad de Chagas del estado Trujillo; MHOM/BR/1953/Y, cepa de referencia obtenida por nosotros

en el año 1987 en ratones NMRI. Estos materiales son mantenidos en nuestro laboratorio mediante pases sucesivos chipo-ratón-chipo, dos veces al año, con el propósito de preservar sus propiedades originales. El período prepatente de la infección y los niveles de parasitemia en los animales inoculados fueron determinados (8), tres veces por semana, mediante exámenes directos de sangre periférica de la vena de la cola de tres animales por lote, elegidos al azar, hasta la desaparición de la parasitemia o la muerte de los animales, utilizando un microscopio Nikon con aumento de 400X; la mortalidad fue registrada diariamente.

De cada uno de los grupos de animales infectados, dos ratones fueron sacrificados por dislocación cervical en la fase aguda de la infección; las ratas lo fueron mediante sobredosis anestésica con Ketaset (Ketamine HCl 100 mg/ml; Fort Dodge, IA, Estados Unidos) para realizar necropsias de corazón, músculo esquelético, hígado, bazo, pulmón, duodeno y colon. Las muestras fueron fijadas inmediatamente en formol al 10%, trabajadas histológicamente, seccionadas serialmente a 5 µm, teñidas con Hematoxilina-Eosina (H-E) y examinadas microscópicamente (400X) para determinar, en 100 campos/sección, la presencia de pseudoquistes con amastigotes y/o tripomastigotes los cuales fueron fotografiados (400X ó 1.000X) utilizando un microscopio Nikon acoplado a una cámara Nikon modelo Microflex HFX cargada con película Kodak TMAX. El parasitismo tisular fue cuantificado como 0, 1-10, 11-20, 21-30, 31-40, >41 de acuerdo con el número de pseudoquistes/50 campos de 400X y expresado como --, +, ++, +++, +****, +***** correspondiente a ausente, escaso, moderado, abundante, intenso y profuso, respectivamente (9). Los infiltrados inflamatorios, con células linfomacroeosinobasofílicas, fueron calificados como:*= ausentes; **= escasos, pequeños y focalizados; ***= escasos, extensos y dispersos; ****= numerosos, pequeños y dispersos; *****= numerosos, extensos y dispersos.

RESULTADOS

Los comportamientos de las tres subpoblaciones de *T. cruzi* utilizadas fueron, brevemente, las siguientes: en el modelo murino, "Turumo", "Trujillo" y "Y" respectivamente, produjeron prepatencias de 10, 5 y 3 días que se correlacionaron con los promedios de los niveles máximos de parasitemias ($1, 7$ y 22×10^6 tripomastigotes/ml); en los tres casos se produjo 100% de mortalidad transcurridos 19, 13 y 16 días post-infección (p. i.). Estos resultados contrastaron con los obtenidos en las ratas experimentales en las cuales las parasitemias comenzaron a observarse 7 días p.i., alcanzando niveles máximos de $0,2 \times 10^6$ (cepa "Turumo") y $0,4 \times 10^6$ tripomastigotes/ml (cepas "Trujillo" y "Y") sin causar mortalidad, pasando así a la fase crónica de la infección 30 días p.i. El histotropismo, la intensidad del parasitismo tisular así como los niveles de infiltración celular producidos en los dos modelos experimentalmente infectados por las tres cepas de *T. cruzi*, se muestran en las Tablas 1 y 2 y Figura 1 (A, B, C).

Tabla 1. Niveles de parasitismo tisular e infiltración celular producidos en ratones NMRI experimentalmente infectados con cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Visceras Cepas	Corazón	Músculo esquelético	Colon (m.m.)	Duodeno (m.m.)	Hígado	Bazo	Pulmón (músculo)
"Turumo"	+++*	****	+	..*	+	..*	..*
"Trujillo"	+++++**** Miocard.	+++++***** Miosit.	+++++***** Miosit.	+++**	..*	..*	+**
"Y"	+++++**** Miocard.	+++++***** Miosit.	+	+++**	+	+	+

Miocard.=Miocarditis; Miosit.=miositis en músculo esquelético y liso (m.m.) = muscularis mucosa.

Tabla 2. Niveles de parasitismo tisular e infiltración celular producidos en ratas Wistar experimentalmente infectadas con cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Visceras Cepas	Corazón	Músculo esquelético	Colon (m.m.)	Duodeno (m.m.)	Hígado	Bazo	Pulmón (músculo)
"Turumo"	+***	+***	..*	..*	..*	..*	..*
"Trujillo"	+***	..**	..*	..*	..*	..*	..*
"Y"	+***	+***	..*	..*	..*	..*	..*

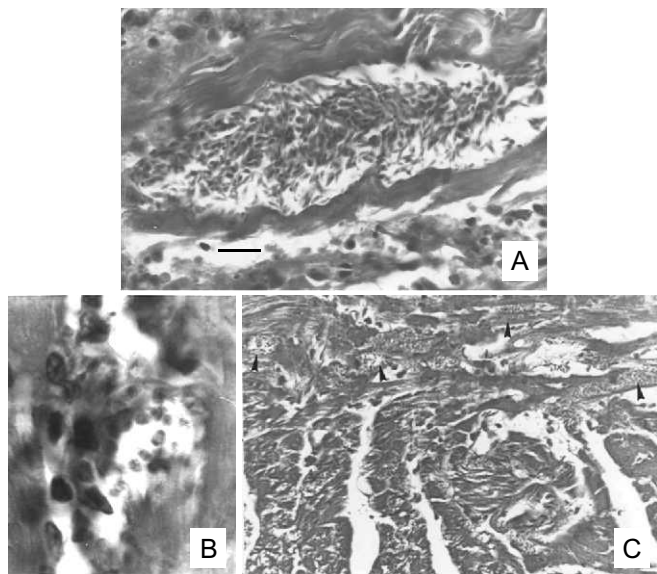


Figura 1. Secciones histológicas de visceras de ratones NMRI y de ratas Wistar infectados experimentalmente con diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. A- Pseudoquiste con tripomastigotes y estadios intermedios acompañado con infiltrados inflamatorios en músculo esquelético de ratón (cepa TPRX/VE/1987/Trujillo; 1.000X); B.- Pseudoquiste con amastigotes e infiltrado inflamatorio en fibra cardiaca de rata (cepa MDID/VE/1989/ Turumo; 1.000X); C.- Vista panorámica de corazón de ratón; se observan varios pseudoquistes (flechas) con amastigotes o tripomastigotes; (cepa MDID/VE/1989/Turumo; 400X). (H-E; Barra= 15 µm).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Todos los animales utilizados fueron susceptibles a la infección por las tres cepas utilizadas; sin embargo, el modelo murino mostró un desarrollo mucho más grave de la parasitosis al alcanzar precozmente niveles de parasitemia de 10^6 e invasión tisular intensa acompañada, en varios casos, de miocarditis y miositis así como de numerosos y extensos infiltrados mononucleares lo cual provocó la muerte de todos los animales en un periodo de 14-18 días. Aún cuando utilizamos ratas jóvenes (50 g promedio), que recibieron inóculos comparables a los de los ratones, fueron sin embargo capaces de controlar la infección por las cepas, lo cual produjo niveles bajos (10^3) e intermitentes de parasitismo en sangre y escasas alteraciones tisulares acompañadas de muy pocos parásitos, que permitieron pasar a la fase crónica de la infección un mes p.i. sin causar mortalidad, a pesar de emplear la cepa "Y" considerada intensamente virulenta y patogénica.

Las tres subpoblaciones de *T. cruzi* mostraron, independientemente de su origen, una clara e intensa afinidad por las musculaturas cardiaca, esquelética y lisa de los ratones, en claro contraste con las ratas en las cuales el miotropismo fue extremadamente escaso.

La resistencia que mostró la rata Wistar a *T. cruzi* al producir niveles bajos de infección por la cepa "Y" (10) ha sido comprobada (11) en un modelo experimental que usó

Trichomys apereoides (Rodentia, Echimyidae) -un roedor caviomorfo que ha mantenido muy antigua asociación evolutiva con este flagelado, por lo cual se ha sugerido que sea un hospedador secular del parásito (12), al usar subpoblaciones de *T. cruzi* tipificadas como *T. cruzi* I y II, entre las cuales se incluyó la cepa "Y". Esta propiedad de la cepa Wistar ha sido mostrada también frente a cepas de *T. cruzi* procedentes de humanos (13, 14) y de triatomíneos (15, 16).

Resultados contrarios a los anteriores fueron obtenidos por varios autores (6) en el modelo utilizado por nosotros. Esta disparidad de comportamiento podría explicarse por la sugerencia según la cual sería la consecuencia de la enorme complejidad de los ciclos de transmisión del parásito, donde numerosos mamíferos son infectados por una amplia gama de especies vectoras (11). Estos autores enfatizan que las subpoblaciones del patógeno pueden enfrentarse en la naturaleza a procesos selectivos, diferentes y particulares, de cada especie hospedadora mediante factores como origen y peso del material infectante, coinfección con otras especies de *Trypanosoma*, de diferentes subpoblaciones de *T. cruzi* y de otros parásitos así como el estado fisiológico e inmunológico del mamífero.

De acuerdo con la bibliografía consultada, en relación con los modelos de mamíferos utilizados para el estudio de la dinámica de la infección experimental por *T. cruzi*, el ratón y el perro son aceptados como los modelos más apropiados, en tanto que el conejo y el mono serían útiles pero no ideales; el hámster ha dado buenos resultados en los escasos estudios sobre alteraciones histopatológicas genito-uritarias. Acerca del cobayo y la rata, las opiniones son diversas aún cuando algunos autores señalan a esta última como un animal tan útil como los dos primeros citados, por reproducir con gran semejanza el desarrollo de la enfermedad de Chagas (6, 17, 18, 19, 10, 20).

T. cruzi, al igual que otros microorganismos patógenos intracelulares, moviliza en el mamífero infectado múltiples mecanismos humorales y celulares de la respuesta inmune innata (natural) y adquirida. Así, está bien establecido que células, moléculas y mecanismos efectores del sistema inmune son responsables por el control de la multiplicación del parásito en los tejidos así como de las lesiones resultantes de la actividad antiparasitaria; pudiendo las diferentes cepas del parásito determinar diferentes respuestas inmunológicas en cepas murinas. Por otra parte, se ha postulado que la resistencia/sensibilidad a la infección aguda por *T. cruzi* en linajes de ratones, es un carácter gobernado por múltiples genes dentro y fuera del locus H-2 (sistema de antígenos de histocompatibilidad murina); estudios con cepas susceptibles (C_3H) y resistentes ($C_{57}BL$) mostraron que la resistencia fue un trazo dominante que incrementó con la heterocigosidad genética (5, 6, 21).

Asimismo, grados variables de comportamiento en la infección por el parásito fueron producidos en diferentes cepas endógamas de ratas, desde resistencia completa, baja, moderada y ausente; sin embargo, parasitemia y mortalidad no se relacionaron necesariamente (22).

Las consideraciones anteriores se plantean en base a la dificultad, de vieja data, de explicar el significado de virulencia y patogenicidad en las interacciones parásito-hospedador. Dado lo complejo del tema, referiremos ambos conceptos a los protozoarios que utilizan al hombre como hospedador. Se señala que, en las asociaciones microbianas, ambas

propiedades son expresadas solo cuando el microorganismo y el hospedador susceptible se encuentran (23), por lo cual no son variables independientes sino que son el producto de la interacción del complejo constituido por ambos socios (24). La demostración de esta aseveración la muestran, en forma similar, protozoarios considerados virulentos y patógenos que no se expresan como tales en el ambiente que le ofrezca un hospedador cuyo sistema inmune se encuentra intacto y, por el contrario, parásitos usualmente avirulentos causan enfermedad en hospedadores inmunocomprometidos. El aumento de los trabajos que señalan los daños que producen microorganismos avirulentos (*Cryptosporidium* spp., *Pneumocystis carinii*) en humanos infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), que deteriora la inmunidad celular, viene desarrollando el campo de investigación de los así llamados "parásitos oportunistas" que causan enfermedades infecciosas emergentes, o bien reemergentes en hospedadores sidosos infectados con *T. cruzi* (23, 25); estas situaciones muestran que factores dependientes del hospedador, más que del microorganismo, son determinantes críticos del resultado de dicha asociación. Virulencia y patogenicidad son entonces propiedades claramente complejas, dinámicas y, por ello, cambiables que incluyen factores dependientes de los asociados, las cuales determinan que el resultado pueda ser la eliminación del parásito, su disminución a niveles críticos o la muerte del hospedador.

Como ya señalado, el comportamiento de cepas de *T. cruzi* en infecciones únicas, que muestran una gama de resultados en cepas diferentes de hospedadores experimentales (ratón, rata; 22, 26) es una demostración obvia de la importancia del hospedador. El protozoario, como componente de la asociación, aporta factores fundamentales tales como su capacidad de adhesión, invasión, evasión o regulación de su detección y proliferación en el hospedador, las cuales pueden ser, a su vez, controladas por este último (6, 23).

En base a la discusión anterior, podríamos aceptar la sugerencia acerca de que los términos virulencia y patogenicidad no deben ser usados fuera de contexto al tratar de determinar el daño que se produce en una relación parásito-hospedador, por cuanto esto llevaría a darle mayor peso a los atributos del hospedador en detrimento de los propios del parásito y viceversa (23). Igualmente pensamos, que lo importante en dicha relación es el resultado que de ella se produce, más que conceptualizar dichos términos por separado. Virulencia y patogenicidad serían las propiedades relativas que un protozoario logre expresar en un hospedador para producir daño, en la cantidad y calidad, que el tipo de asociación permita.

AGRADECIMIENTOS

Al MSc. Ian Mclure, por concedernos su valioso tiempo en asistimos en el manejo y cuidado de los insectos y animales experimentales; a la Sra. Estefanía Flores por su diligente ayuda en el trabajo histológico; al TSU. Adrián Chang por su hábil auxilio en la redacción del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dias JCP. Epidemiología. En: Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M, editores. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2000; p. 48-74.
2. Lenzi H, Oliveira D, Lima M, Gattas C. *Trypanosoma cruzi*: Paninfectivity of CL strain during murine acute infection. Exp Parasitol 1996; 84: 16-27.
3. Pinho A, Cupolillo E, Mangia R, Fernandes O, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 2000; 94: 509-514.
4. Jansen, AM, Pinho A, Lisboa C., Cupolillo E., Mangia R, Fernandes O. The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. 1999; Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94: 203-204.
5. Dos Reis G, Lopes M. A resposta imune á infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em modelos experimentais. En: Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M, editores. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2000; p. 153-169.
6. Andrade SG. Patologia experimental da doença de Chagas. En: Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto M, editores. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2000; p. 177-200.
7. Anonymous. Recommendations from a satellite meeting. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94: 429-432.
8. Brener Z Therapeutic activity and criterion of cure of mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1962; 4:389-396.
9. Morocoima A, Rodríguez M, Herrera L, Urdaneta-Morales S. *Trypanosoma cruzi*: experimental parasitism of bone and cartilage. Parasitol Res 2006; 99: 663-668.
10. Moreno E, Araujo M, Alarcón M, de Yarbuh A, Araujo S, Borges R. Efectos de la infección chagásica aguda em ratas Wistar gestantes. Rev Cient FCV 2006; 16: 505-516.
11. Herrera L, Xavier S, Viegas C, Martínez C, Cotias P, Carrasco et al., *Trypanosoma cruzi* in a caviomorph rodent: parasitological and pathological features of the experimental infection of *Trichomys apereoides* (*Rodentia*, *Echimyidae*). Exp Parasitol 2004; 107: 78-88.
12. Buscaglia CA, Di Noia JM. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and epidemiology of Chagas disease. Microb Infect 2003; 5: 419-427.13.
13. Arankowsky-Sandoval G, Mut-Martin M, Solís-Rodríguez F, Góngora-Alfaro J, Barrera-Pérez M. Sleep and memory deficits in the rat produced by experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. Neurosc Letters 2001; 306: 65-68.
14. De Oliveira K, de Souza Junior N, da Mata F, Sabóia-Morais T, Aversi-Ferreira T, da Mata J. Acute alterations induced in Wistar rats by *Trypanosoma cruzi*. Rev Univ Fed Goiás. 2007; IV: 86-94.
15. Herrer A, Diaz J. Trypanosomiasis americana en el Perú. VII. Cepas del *Trypanosoma cruzi* de escasa virulência. Rev peruana med exp salud pub 1955; 9: 1-2.
16. Alarcón M, de Yarbuh A, Moreno E, Payares G, Araujo S, Colmenares M. Presencia de *Trypanosoma cruzi* en tejidos de ratas Wistar infectadas experimentalmente y sus fetos. Bol Malarial SalAmb 2006; XLVI: 137-148.
17. De Lana M, Chiari E, Tafuri WL. Experimental Chagas' disease in dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87: 59-71.
18. Da Silva A, Ramirez L, Vargas M, Chapadeiro E, Brener Z. Evaluation of the rabbit as a model for Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91: 1-2.

19. Samudio M, Montenegro-James S, Kasamatsu E, Cabral M, Schinini A, Rojas de Arias A, et al., Local and systemic cytokine expression during experimental chronic *Trypanosoma cruzi* infection in a Cebus monkey model. *Parasite Immunol* 1999; 21: 451-460.
20. Cabrine-Santos M, dos Santos V, de Lima M, de Abreu M, Lages-Silva E, Ramírez L. Genitourinary changes in hamsters infected and reinfected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 523-528.
21. Júri MA, Ferreira A, Ramos A, Hoecker G. Non-lytic antibodies in H-2-controlled resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi*. *Braz J Med Biol Res* 1990; 23: 685-695.
22. Rivera-Vanderpas MT, Rodriguez AM, Afchain D, Bazin H, Capron A. *Trypanosoma cruzi*: variation in susceptibility of inbred strains of rats. *Acta Trop* 1983; 40: 5-10.
23. Casadevall A, Pirofsky L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis* 2001; 184: 337-344.
24. Poulin R, Combes C. The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitol Today* 1999; 15: 474-475.
25. De Brito C, Pires M, Pacheco R. Chagas disease and HIV co-infection: genetic analyses of two *Trypanosoma cruzi* strains under experimental immunosuppression. *Kinetoplastid biol dis* 2003; 2: 17-24.
26. Zuñiga C, Vargas R, Courcelles M, Vergara U. Infección experimental con *Trypanosoma cruzi* en machos y hembras de tres cepas de ratones. *Parasitol día* 1997; 21: 1-7.